

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

***Genes y mecanismos implicados en la toxicidad inducida por el péptido
amiloide y priones***

Memoria que presenta Tamara Martínez Valcárcel, licenciada en Ciencias Biológicas para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Bajo la dirección del Dr. Angel Pascual García.
Instituto Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM

Madrid 2011

**Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”
CSIC-UAM**

Angel Pascual García, Doctor en Ciencias Químicas por la Universidad Autónoma de Madrid,
Investigador Científico en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols CSIC-UAM,

CERTIFICA que **Tamara Martínez Valcárcel**, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad
Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado:

“Genes y mecanismos implicados en la toxicidad inducida por péptido amiloide y priones”

y considera que el trabajo reúne las condiciones de originalidad y rigor metodológico necesarias para
ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la
Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, expide el presente certificado en Madrid a 31 de Octubre de 2011.



Fdo: Dr. Angel Pascual García
Director de la Tesis

VºB
Tutor: Rafael Garesse

c/Arturo Duperier nº 4
28029 Madrid
España
Tel: 91 585 4460
FAX: 91 585 4401

Agradecimientos.

Al fin llegó este momento! A pesar de que hubo momentos en que creí que esta larga aventura no llegaría a su fin, aquí me encuentro echando la vista atrás y recordando a todas aquellas personas que sin duda han tenido un papel fundamental en la elaboración y desarrollo de esta tesis.

Sin duda quiero empezar por el Doctor Angel Pascual, mi director de tesis, fue él el que me brindó la oportunidad de formar parte de su laboratorio haciéndome partícipe de este interesante proyecto y el mismo que me recogió años después generosamente para poder finalizar su escritura, tras diversas vicisitudes vitales.

Desde los comienzos, este proyecto no fue sencillo, por estar fuera de la línea habitual de trabajo del laboratorio, con ello la ayuda altruista de numerosas personas fue crucial para empezar a despegar. Por ello, de entrada quiero agradecer a la Dra María de Ceballos del Instituto Cajal de Madrid (CSIC) su generosidad y ayuda dándome las claves para la preparación de los péptidos amiloides e igualmente al Dr Bernard Brugg y su equipo del CNRS de Paris por el protocolo de agregación del Prión; gracias a su ayuda los comienzos fueron algo más sencillos. Je vous remercie Dr Brugg vous et votre équipe pour le protocole d'obtention des agrégats ainsi que les conditions de stockage et maintenance du peptide. Grâce à vos conseils et bien sûr à votre gentillesse et amabilité, les débuts furent beaucoup plus légers. Merci toujours. Igualmente quiero agradecer al Dr Sorin Daghrici y a todo el equipo de ciencias computacionales de la Universidad Wayne State en Detroit su ayuda y sus consejos con la interfaz Onto-Tools. Sin su magnífica y altruista ayuda el análisis de datos de los microarrays hubiera sido mucho más complicado. Thank you so much Sorin Daghrici, you and your team: Purvesh, Michele and Calin. Your kindly help and advices were crucial to develop the analysis of microarrays data. Thank you very much for your support with Onto-Tools interface and YEd graph editor. I am very grateful to you!

Gracias a la Dra Ana Aranda, gracias por facilitarme en numerosas ocasiones recursos técnicos y por hacerme partícipe de sus seminarios científicos en los que se compartían e intercambiaban conocimientos. Gracias por adoptarme como un componente más de tu laboratorio. Gracias a los chicos y chicas de Ana Aranda, muchos de vosotros no lo sabéis pero me habéis enseñado tantas cosas!. De todos y cada uno de vosotros he aprendido algo: Aurora, Olaya, Susana, Marina, Maxy, Daniela, Mila, Zambrano, Anabel, Borja, Ángeles, Anita, Ruty (Ay mi Ruty!), Jose Miguel y Josune.

Quiero agradecer especialmente al Doctor Borja Belandia y a la Doctora Ana Aranda que me permitieran utilizar su aparato de PCR cuantitativa, creo que si no hubieran decidido hacer esa magnífica inversión para el labo yo aún estaría levantándome a las 5:00 de la mañana para poder poner la QPCR común a las 6:00, antes de que empezaran los turnos diarios, para poder validar mis miles de genes obtenidos de los Microarrays. Por aquel entonces mi calidad de vida mejoró mucho así que nunca os lo podré agradecer lo suficiente. Gracias.

José Miguel, todo lo que pueda decir de ti y te pueda agradecer siempre será poco. Tú has sido una de las personas que ha sido y siempre será mi referente. Tú me ayudaste a construir lo que soy científicamente hablando, aunque también lo hiciste como persona. Tú eres mi ejemplo a seguir de un trabajo pulcro, meticuloso, reflexionado, con una dirección. Tú me has enseñado a plantearme dudas, a pensar globalmente, a criticar mi trabajo, a estar en un constante aprendizaje y estudio. Gracias por compartir conmigo tus conocimientos, tu forma de trabajo, por ayudarme en los momentos difíciles, por enseñarme, por tu generosidad, tú has sido mi maestro, mi joda personal=). Tú eres en parte responsable de lo que soy. Gracias por hacerme creer en mí y hacerme ver que si era posible. Conocerte y aprender de ti ha sido un maravilloso regalo. Gracias por ser uno de mis pilares.

Josune, mi otro pilar...el mayor ejemplo de constancia, fuerza ante la adversidad, valor, dedicación, generosidad y comprensión. Fue una gozada poder tenerte cerca, aprender de tu forma práctica y meticulosa de ver y abordar el trabajo y la vida. Tú me enseñaste a afrontar las cosas con valor, aligerando la carga de las dificultades. Me enseñaste a relativizar

los contratiempos. Gracias por tu cariño, por tus palabras, por tus consejos y tus conocimientos. Nunca te podré agradecer la comprensión y la mano que me tendiste desde el día 1 sin conocerme apenas. Tú eres otro de esos regalos que la vida me ha dado. Gracias y más gracias!!!!.

Anita, gracias por esos momentos de aliento en los que el ánimo se venía abajo. Gracias por haber valorado siempre mi opinión y mi esfuerzo. Gracias por confiar y contar conmigo siempre que lo has necesitado. Gracias por mostrarme tu respeto como profesional. Es y ha sido muy importante para mí. Gracias!!!!

Ruty, mi "alter ego", tú eres otra de esas personas de la que he aprendido y que me ha hecho aprender tanto de mi misma. Son tantas y tan parecidas las dificultades vitales que hemos tenido, que como tu dijiste en su momento asustan;-). Gracias por tus risas, tu humor, por tu cariño enmascarado, tu hiciste que la vida dentro y fuera del labo fuera mas divertida y llevadera. Tú me hacías olvidar las dificultades y coger fuerzas para seguir en el siguiente paso, cuando el aire faltaba.

Gracias a la ya Doctora Marta Cortón. Mi gran amiga Martuchi. Creo que no tengo palabras ni tendré el tiempo suficiente para agradecerte todo lo que has hecho por mí todos estos años. Gracias a ti la palabra Amistad cobra todo su sentido. Compartimos tantas cosas durante los años de tesis! Y después!. Dificultades, alegrías, decepciones, desesperanza, fuerza. Creo que una de las mejores cosas que me he llevado de allí es tu amistad. Gracias por tu ayuda en los primeros momentos con los microarrays, tú aliviaste el camino pues ya estabas luchando por entender ese complejo mundo. Tu ayuda fue fundamental. Sólo alguien que ha tenido que lidiar con datos de este calibre sabe el trabajo que conlleva y lo complejo que puede llegar a ser. Gracias por tu calidad humana, por tu cariño, tu comprensión, tu inteligencia, tus ganas constantes de aprender y por ser una de las personas que me ha demostrado y demuestra día tras día su calidad como científico. Te admiro pequeña!. Espero que la vida te premie con lo que te mereces: TODO y todas las personas que tengas en tu entorno sepan valorar a la magnífica profesional que tienen delante. Millones de Gracias!.

Gracias a mis dos pequeños "hermanucos" Ascen y Lauro hemos pasado tantas cosas juntos en el labo! que casi podría decir que os considero como a mis hermanos pequeños. Lauro, gracias por esa maestría en relativizar las cosas, por esa inteligencia, por esas risas que nos echamos y por aguantar a la "viejuna cansina". Te admiro y quiero que lo sepas. Azenzió! Millones de gracias por tu cariño, por esa paciencia desbordante, por esa capacidad de escucha, por esa generosidad y por esas palabras que aunque no eran muchas en muchas ocasiones eran muy acertadas. Gracias por vuestras risas, vuestra comprensión, vuestros silencios. Vosotros le dabais vida y alegría a ese laboratorio. Vuestra amistad y vuestra calidad humana es sin duda otro de los regalos que me llevo, y espero poder tener siempre en mi vida.

Ahora a los de fuera,

Gracias a Manu (la Manuterapia ha sido siempre tan efectiva!!). Gracias por existir y ser como eres, tu sentido del humor y tu cariño me han ayudado en incontables ocasiones a distenderme, a relajarme y a recargar las pilas para después seguir. A pesar de no entender ni papa de lo que te contábamos Martuchi y yo aguantabas estoicamente nuestras discusiones y cuitas científicas y laborales. Es maravilloso tenerte cerca. Gracias!.

Rodri (tu también sabes lo que es esto), Sylvi, Lisy, Mary, Andrea, Patri, Mariuca, Johan, José Ramón vosotros habéis contribuido a mantener mi estabilidad mental en estos años y en los últimos meses (tarea difícil ;-)). Gracias por vuestras conversaciones, vuestro cariño, vuestros consejos, a fin de cuentas por compartir vuestra vida conmigo es una suerte contar con vuestra amistad.

Joaquín, gracias por tu ayuda con las herramientas informáticas, me has sacado de algún apuro y sobre todo por esa generosidad que regalas a todos los que están a tu alrededor, es maravilloso encontrarse a gente como tu por el mundo. Siempre dispuesta a ayudar.

Carlos, tú no podías faltar aquí. Siempre has sido una de las personas que mas ha creído en mí, incluso cuando ni yo misma me creía capaz, siempre me mostraste tu admiración y cariño con hechos, algo que he sabido valorar con el tiempo. Siempre me animaste y empujaste en los momentos de dificultad en el desarrollo de esta tesis. Siempre tendrás un hueco en mi corazón.

Javi, como en otros momentos importantes de mi vida en el que fuiste el catalizador de decisiones críticas para mi, tú fuiste el detonante de que retomara las riendas de mi vida en uno de los momentos más difíciles en el que todo se tambaleaba bajo mis pies. Tú, sin saberlo, me ayudaste a sacar esa raza que tenía dormida y me hizo retomar la tesis de nuevo. Tú fuiste el caos y el orden, así que gracias por ello.

Gracias a la Doctora Ana Isabel Jiménez, mi jefa, tú siempre me animaste a retomar la escritura de la tesis. Gracias por confiar en mí cada día y mostrarme tu respeto. Gracias a todos los que me habéis animado en estos últimos y duros meses en los que he compatibilizado trabajo y escritura, Yolanda (Yoliperri), Gema (Bambú), Amor, Vicky, Verónica, Cova y Laura. Vuestros ánimos me han dado fuerzas para seguir con adelante y pensar que el final estaba más cerca. A todos los del labo (Susana, Pequevero, Ascen y Daniel). Gracias por enseñarme algo cada día, aprendo mucho de vosotros. Mochi y Nata. Gracias por vuestro cariño, vuestro sentido del humor, vuestra capacidad de escucha y empatía; me habéis levantado en momentos muy muy duros y ayudado a sacar fuerzas de flaqueza, cuando más falta me hacía. Siempre os lo agradeceré--). Gracias por estar ahí.

A mis padres,

Por darme todo sin esperar nada a cambio, por disfrutar y sufrir conmigo, por enseñarme a vivir. Por darme todos los valores y recursos que me han permitido afrontar cada dificultad con fortaleza y tesón durante el desarrollo de esta tesis. Sin vuestro apoyo, colaboración e inspiración habría sido imposible llevar a cabo esta dura empresa. Gracias por ser un ejemplo de lucha, honestidad, tenacidad, superación, inteligencia, paciencia, generosidad, y compromiso. Vosotros sois mi razón de ser y vivir. Nunca jamás os podré agradecer toda la ayuda, el cariño y amor que me mostráis con cada uno de vuestros actos. Sois mi base, mi referencia.

A mi abueluco Marcos,

Allí, en tu memoria, ¿cómo yo podría?
Llenar tus silencios de inmensa alegría.
Romper la cadena que a veces tortura,
borrar de tus horas lo que hay de amargura.

Al cristo de los pescadores,

Se que te han hecho trabajar mucho, Gracias!

Y por último quiero agradecer expresamente su ayuda a los chicos del departamento de Imagen del IIB, Javier y Daniel, cuando ya no me quedaban fuerzas para afrontar más dificultades con la maquetación de la tesis ellos de forma generosa y altruista me han ayudado. Chicos, no os lo podré agradecer suficiente. Ya en el final todo es un mundo y vosotros me habéis ayudado a ver la luz al final del túnel. Gracias.

Gracias a todos, esta tesis es un poquito de todos vosotros.

ABSTRACT.

Alzheimer and Prion diseases are a group of neurodegenerative disorders characterized by astrogliosis and progressive neuronal degeneration. As a causative agent, prions and β -amyloid proteins have been intensely investigated in different *in vitro* and *in vivo* experimental models. However, the mechanisms and pathways involved in prion- or β -amyloid-induced neurological dysfunction are poorly understood. Compelling evidence suggest that misfolded prions and β -amyloid-protein aggregates, play an important role in cell dysfunction and tissue damage, leading to disease in both pathologies. Prion protein (Prion diseases) and β -amyloid (Alzheimer's disease) are proteins that trigger disease when they get misfolded. Several lines of evidence suggest that a defective protein folding is a central event in both Alzheimer's and Prion disease. Although the two disorders are very different clinically, neuropathologically, and biochemically, the molecular event that may trigger the disease process appears to be the same: the formation of an altered protein conformer, the amyloid aggregates, composed of a high content of beta-sheet structure. Several mechanisms have been proposed to be involved in the amyloid-induced neurotoxicity; among others it has been suggested that amyloid peptides exerts their toxic effect mainly by activating the surrounding microglia population, which in turn induces the synthesis and release of proapoptotic and pro-inflammatory factors. In addition, a direct effect of β -amyloid and prions on neurons has also been described. In fact, the precise mechanisms involved in the β -amyloid and prions-induced neurotoxicity have not yet been definitely clarified. To characterize the effects directly induced on neurons, we have analyzed the gene expression profile induced by synthetic peptides corresponding to the most neurotoxic regions of prions and β -amyloid peptides, PrP 106-126 and A β 25-35 respectively. Using an Array HG-U133 plus 2.0 and quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction method, we have analysed in SH-SY5Y cells the effects of these peptides. Our results show that addition of these peptides to the neuronal culture specifically changes the expression of a relative high number of genes, modifying several pathways and biological processes in a common way and causes progressive neuronal death even in the absence of microglia. These results may be useful as novel therapeutic approaches for Alzheimer's and Prion diseases.

RESUMEN.

La enfermedad de Alzheimer y las Prionopatías pertenecen a un grupo de enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por la presencia de astrocitosis y degeneración neuronal progresiva. Como agente causante de cada una de las patologías, los priones y las proteínas β -amiloides han sido profundamente investigadas en diferentes modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*. A pesar de todo, los mecanismos y las rutas implicadas en las disfunciones neurológicas inducidas por priones y proteínas β -amiloides son aún poco conocidas. Son numerosas las evidencias que sugieren cómo los agregados proteicos compuestos por péptidos amiloideos mal plegados, juegan un papel fundamental en la disfunción celular y el daño tisular tan característicos de ambas enfermedades. La proteína prionica (en las prionopatías) y la proteína β -amiloide (en la enfermedad de Alzheimer), son proteínas que desencadenan la enfermedad cuando se encuentran anormalmente plegadas. A pesar de que las dos patologías presentan claras diferencias clínicas, neuropatológicas y bioquímicas, diversas líneas de investigación sugieren cómo un mal funcionamiento en los procesos de plegamiento proteico constituyen un evento principal tanto en las prionopatías como en la enfermedad de Alzheimer, mostrando como principal evento molecular de la neurodegeneración la formación de agregados amiloideos proteicos mal plegados, con un alto contenido en estructuras β -laminares. Distintos mecanismos han sido propuestos como desencadenantes de la neurotoxicidad asociada a los péptidos amiloideos, entre otros, la toxicidad podría ser resultado de la activación de la microglia circundante, por los péptidos amiloideos, con la consiguiente liberación de factores pre-apoptóticos y pro-inflamatorios o bien ser resultado de un efecto directo de las proteínas amiloideas sobre la neurona. Los mecanismos exactos asociados a la neurotoxicidad inducida por priones y por péptidos β -amiloides no es clara aún hoy día, por ello es necesario destinar gran parte de los esfuerzos en la descripción y caracterización de los mecanismos subyacentes asociados a los péptidos amiloideos. Con el fin de caracterizar los efectos neurotóxicos directamente inducidos sobre la neurona, analizamos los perfiles de expresión génica inducidos por los péptidos sintéticos PrP 106-126 y A β 25-35, correspondientes a las regiones más neurotóxicas de los priones y péptidos β -amiloides, respectivamente. Utilizando la tecnología de *microarrays* de expresión *Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0* y la PCR en tiempo real, analizamos el efecto neurotóxico de ambos péptidos en células neuronales SH-SY5Y. Nuestros resultados muestran cómo la adición del PrP 106-126 y el A β 25-35 al cultivo neuronal producían cambios específicos en la expresión génica de numerosos genes, modificando diversas rutas y procesos moleculares y biológicos de forma común, así como causaban la muerte neuronal de forma progresiva en ausencia de glia. Estos resultados podrían ser por tanto útiles como soporte a nuevas aproximaciones terapéuticas para la enfermedad de Alzheimer y las prionopatías.

INDICE

CLAVE DE ABREVIATURAS	i
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. Neuropatología y bases moleculares de la enfermedad de Alzheimer.	1
1.1.1. Descripción de la proteína precursora amiloide (APP) y la hipótesis de la cascada A β .	2
1.1.2. Descripción de la proteína Tau y los ovillos neurofibrilares.	5
1.2. Neuropatología y bases moleculares de las prionopatías.	6
1.2.1. Caracterización de la Proteína priónica celular (PrP ^c) y la proteína priónica patógena (PrP ^{sc}).	6
1.3. Mecanismos de muerte neuronal en la enfermedad de Alzheimer y en las Prionopatías.	8
1.3.1. Hipótesis de la pérdida de función de la proteína nativa.	8
1.3.2. Hipótesis de la adquisición de nuevas funciones neurotóxicas.	8
1.3.3. Hipótesis de la inflamación.	9
1.4. Utilización de péptidos sintéticos en modelos de neurotoxicidad: A β 25-35 y PrP106-126.	9
1.4.1. A β 25-35.	10
1.4.2. PrP106-126.	11
1.5. La genómica funcional como herramienta en el estudio del Alzheimer y las prionopatías.	11
2. OBJETIVOS.	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	14
3.1. Materiales.	14
3.1.1. Productos.	14
3.1.2. Anticuerpos.	14
3.1.3. Líneas celulares.	14
3.1.4. Péptidos.	15
3.2. Métodos.	15
3.2.1. Cultivos celulares.	15
3.2.2. Preparación y agregación de los péptidos A β 25-35 y PrP106-126	15
3.2.3. Ensayos TUNEL (Terminal deoxynucleotide transferase-mediated dUTP Nick end-label)	15
3.2.4. Ensayos de viabilidad celular (MTT).	16
3.2.5. Inmunodetección de proteínas.	16
3.2.6. Análisis de ARN.	17
3.2.6.1. Extracción de ARN.	17
3.2.6.2. Análisis de la expresión génica con la plataforma Genechip® de Affymetrix.	17
3.2.7. RT-PCR en tiempo real.	23

4. RESULTADOS.	26
4.1. Los péptidos neurotóxicos A β 25-35 y PrP106-126 producen una reducción de la viabilidad celular e inducen la apoptosis en células SH-SY5Y.	26
4.1.1. El A β 25-35 y el PrP106-126 producen una reducción de la viabilidad celular en células SH-SY5Y.	26
4.1.2. A β 25-35 y el PrP106-126 activan la expresión de marcadores apoptóticos en células SH-SY5Y.	30
4.2. Los perfiles de expresión génica asociados a la toxicidad inducida por el A β 25-35 y PrP106-126 presentan numerosos genes, rutas de transducción de señal, funciones moleculares y biológicas reguladas de forma homóloga.	32
4.2.1. Diseño experimental, hibridación de microarrays, controles de calidad y pre-procesamiento de los datos.	32
4.2.2. Análisis e integración funcional de los perfiles de expresión génica asociados a la toxicidad inducida por el A β 25-35 y por el PrP106-126.	33
4.2.2.1. Análisis descriptivo.	33
4.2.2.2. Análisis de Ontología Génica: Procesos Moleculares, Funciones biológicas, Rutas de transducción y regulación transcripcional.	39
4.2.2.3. Clustering jerárquico: Análisis detallado de los distintos subclusters mediante herramientas de Ontología Génica (OntoExpress y PathwayExpress).	79
4.3. Análisis individual de genes regulados como consecuencia de la toxicidad inducida por el A β 25-35 y por el PrP 106-126 y validación de los mismos por RT-PCR en tiempo real.	85
4.3.1. Validación por qRT-PCR en tiempo real.	85
4.3.2. Confirmación de genes regulados: Patrón de expresión temporal.	88
5. DISCUSIÓN.	94
6. CONCLUSIONES.	105
7. BIBLIOGRAFÍA.	106
8. ANEXOS.	120

CLAVE DE ABREVIATURAS

Acrónimo	Inglés	Castellano
Aβ	Amyloid β	β-amiloide
Aβ-Reg	---	Aβ-Regulado
AD	Alzheimer Disease	Enfermedad de Alzheimer
AC		Adenilato ciclasa
ADCY6		Adenilato ciclasa 6
ADCY8		Adenilato ciclasa 8
ADN	---	Acido desoxirribonucleico
ADNc	---	Acido desoxirribonucleico copia
AICD	Intracellular Cytoplasmic/C-terminal Domain	Dominio carboxilo terminal intracelular
Ala	---	Alanina
ANAPC10	Anaphase-Promoting Complex subunit 10	Subunidad 10 del complejo promotor de la Anafase
APH-1	Anterior pharynx-defective 1	--
APOE	Apolipoprotein E	Aplipoproteína E
APP	Amyloid protein precursor	Proteína precursora amiloide
APPsα	Amyloid protein precursor secreted α	Proteína precursora amiloide secretada α
APPsβ	Amyloid protein precursor secreted β	Proteína precursora amiloide secretada β
ARN	---	Acido ribonucleico
ARNc	--	Acido ribonucleico copia
Asn	--	Asparagina
Asp	--	Aspártico
ASPM	Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein	--
ATF4	Activating Transcription Factor 4	Factor de transcripción activador 4
ATM	Ataxia telangiectasia mutated	--
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related	--
BAX	BCL2-associated X protein	--
BCA	Bicinchoninic acid	Ácido bicinconínico
BIRC3	Baculoviral IAP repeat-containing protein 3	--
BUB-1	Budding uninhibited by benzimidazoles 1	--
CAR	Constitutive active/androstane receptor	Receptor de Androstano
CAMKII	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II	Protein quinasa II dependiente de Calcio/Calmodulina
CAMK2B	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II beta chain	Subunidad beta de protein quinasa II dependiente de Calcio/Calmodulina
CACNA1D	Calcium channel, voltage-dependent, L type, subunit alpha 1D	Subunidad 1 alpha D del canal dependiente de voltaje tipo L.
CCNA1	Cyclin-A1	Ciclina A1
CCAR1	Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1	Proteína reguladora de la división celular y la apoptosis
CCNH	Cyclin H	Ciclina H
CDCs	Cell-division-cycle	--
CDC2	Cell-division-cycle 2	--
CDC6	Cell-division-cycle 6	--
CDC25A	Cell division cycle 25 homolog A	--
CCNs	Cyclins	Ciclinas
CCNA2	Cyclin A1	Ciclina A1
CCNB	Cyclin B	Ciclina B
CCNE	Cyclin E	Ciclina E
CCND1	Cyclin D1	Ciclina D1
CCND3	Cyclin D3	Ciclina D1
CDKs	Cyclin-dependent kinases	Quinasas dependientes de ciclina
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1	Quinasa dependiente de ciclina 1
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2	Quinasa dependiente de ciclina 2
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4	Quinasa dependiente de ciclina 4
CDK5	Cyclin-dependent kinase 5	Quinasa dependiente de ciclina 5
CDK6	Cyclin-dependent kinase 6	Quinasa dependiente de ciclina 6
CDKIs	Cyclin-dependent kinase inhibitors	Inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas
CDX	Caudal type Homeobox	--
CENPE	Centromere-associated protein E	Proteína E asociada a centrómeros
CEP55	Centrosomal protein of 55 kDa	Proteína centrosómica de 55kDa
CHK1	--	--

CO ₂	--	Dióxido de carbono
COUP	<i>Chicken ovalbumin upstream promoter</i>	--
C10RF63	<i>C1 Open Reading frame 63</i>	C1 marco abierto de lectura 63
CREB	<i>cAMP response element-binding</i>	Elemento de respuesta a AMPc
CROP	<i>Cisplatin resistance-associated overexpressed protein</i>	Proteína sobre-expresada asociada a la resistencia a Cisplatino
CRTAP	<i>Cartilage associated protein</i>	--
c-SRC	<i>Cellular sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog</i>	--
C _t	<i>Crossing threshold</i>	Umbral de corte
β-CTF	<i>Carboxy-terminal fragment β</i>	Fragmento carboxilo terminal β
ε-CTF	<i>Carboxy- terminal fragment ε</i>	Fragmento carboxilo terminal ε
γ-CTF	<i>Carboxy-terminal fragment γ</i>	Fragmento carboxilo terminal γ
CUL2	<i>Cullin 2</i>	Cullina 2
CUL3	<i>Cullin 3</i>	Cullina 3
CUL4A	<i>Cullin 4A</i>	Cullina 4
CXCL2	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 2</i>	--
DAG	--	D-1,2-Diacilglicerol
DEPC	--	Dietilpirocarbonato
DKK1	<i>Dickkopf-related protein 1</i>	--
dNTPs	<i>Deoxynucleotide Triphosphates</i>	Deoxinucleótidos trifosfato
dT	<i>DeoxyTimidine</i>	Deoxitimidina
E2F	--	--
EGR1	<i>Early growth response protein 1</i>	--
ELK-1	<i>E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1</i>	--
EST	<i>expressed sequence tags</i>	--
c-ETS-1p54	<i>c-expressed sequence tag-1p54</i>	--
FDR	<i>False Discovery Rate</i>	--
FOS	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>	--
G1	<i>Gap 1</i>	--
G2	<i>Gap 2</i>	--
GABP	<i>GA-binding protein</i>	--
GADD45A	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible protein</i>	--
Gly	--	Glicina
GPI	<i>Glycosyl-phosphatidylinositol</i>	Glicosil-fosfatidil inositol
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>	Glicógeno sintasa 3 quinasa
GSK3β	<i>Glycogen synthase kinase 3 β</i>	Glicógeno sintasa 3 quinasa β
GnRH	<i>Gonadotropin-releasing hormone</i>	Hormona liberadora de la gonadotropina
GnRH1	<i>GNRH1 gonadotropin-releasing hormone 1</i>	Hormona liberadora de la gonadotropina tipo 1
GnRHII	<i>GNRH1 gonadotropin-releasing hormone 2</i>	Hormona liberadora de la gonadotropina tipo 2
GnRHIII	<i>GNRH1 gonadotropin-releasing hormone 3</i>	Hormona liberadora de la gonadotropina tipo 2
GNRH2	<i>GNRH1 gonadotropin-releasing hormone 2</i>	Hormona liberadora de la gonadotropina tipo 2
GnRHR	<i>Gonadotropin-releasing hormone receptor</i>	Receptor de la hormona liberadora de la gonadotropina
GR	<i>Glucocorticoid receptor</i>	Receptor de Glucocorticoides
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>	--
H2AFX	<i>H2A histone family, member X.</i>	--
H2Ax	<i>Histone H2A x</i>	Histona H2A x
Hand1:E47	--	--
His	--	Histidina
HNF-1	<i>Hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A</i>	--
hnRNP a2/b1	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1</i>	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea A2/B1
HR	--	--
IF	<i>Impact Factor</i>	Factor de impacto
Ileu	--	Isoleucina
IP3	--	Inositol trifosfato
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>	--
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>	--
KIF-1	<i>Kinesin 1</i>	Kinesina 1
Leu	--	Leucina
LIG4	<i>DNA Ligase IV. gene</i>	Gen codificante para la ADN Ligasa IV
LIM3/LMO3	<i>LIM domain only protein 3</i>	--

LOC65998	--	--
LXR	<i>The liver X receptor</i>	--
Lys	--	Lisina
M	--	Mitosis
MAD2A	<i>Mitotic spindle assembly checkpoint protein</i>	--
MAD2L1	<i>MAD2 mitotic arrest deficient-like 1</i>	--
MAD1	<i>Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD1</i>	--
MAD1L	<i>MAD1 mitotic arrest deficient-like 1</i>	--
MDM2	<i>murine doble minute 2</i>	--
MAP9	<i>microtubule-associated protein 9.</i>	--
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>	MAP quinasas
MARK	<i>Microtubule Affinity Regulating Kinases</i>	Quinasas reguladoras de afinidad por los microtúbulos
MAT1	<i>menage a trois homolog 1, cyclin H assembly factor (Xenopus laevis)</i>	--
MEF-3	--	--
Met	--	Metionina
MGC3032	--	--
MNR	<i>Mre11-Nbs1-Rad50</i>	Mre11-Nbs1-Rad50
MRE-11	<i>meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)</i>	--
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>	--
MTT	--	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2, 5 difenil
NADH	--	tetrazolio
NBN/NBS	<i>Nibrin</i>	nicotinamida adenina dinucleótida
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	Nibrina
NBP014	--	--
NEK2	<i>NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2</i>	--
NFT	<i>Neurofibrillary tangles</i>	Ovillos neurofibrilares
NFkB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>	--
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>	--
Nkx2-2	<i>NK2 transcription factor related, locus 2</i>	--
Nkx2-5	<i>NK2 transcription factor related, locus 5</i>	--
Nleu	--	Norleucina
NP40	--	Nonidet 40
NRF2	<i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>	--
p75NTR	--	Receptor de baja afinidad para neurotrofinas
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>	Poli (ADP-ribosa) polymerasa
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>	--
PHFs	<i>Paired helical Filaments</i>	--
PKA	<i>Protein kinase A</i>	Proteína quinasa A
PKC	<i>Protein kinase C</i>	Proteína quinasa C
PLA2B1	<i>phospholipase A2, group IIB1</i>	Fosfolipasa A2, grupo IIb1
PLA2G6	<i>phospholipase A2, group VI (cytosolic, calcium-independent)</i>	Fosfolipasa A2, grupo VI
PLA2G2E	<i>phospholipase A2, group IIE</i>	Fosfolipasa A2, grupo IIE
PLA2G2F	<i>phospholipase A2, group IIF</i>	Fosfolipasa A2, grupo IIF
PLC	<i>phospholipase C</i>	Fosfolipasa C
PLD1	<i>phospholipase D1</i>	Fosfolipasa D1
PLK	<i>Polo Like Kinase</i>	--
PM	<i>Perfect match</i>	--
PMM	<i>Perfect mismatch</i>	--
PrP	--	Prión
PrP ^c	--	Proteína Priónica celular
PrP ^{sc}	--	Proteína priónica Scrapie
PRNP	<i>prion protein gene</i>	Gen de la proteína prionica
PrP-Reg	--	Regulado por Prión
PXR	<i>pregnane X receptor (PXR)/nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2</i>	--
QPPD	<i>Quantitative Primer Database</i>	--
QPCR	<i>Quantitative polimerase chain reaction</i>	--
qRT-PCR	<i>Real time retro-transcription - and Polymerase Chain Reaction</i>	Reacción en cadena de la polimerasa y retrotranscripción en tiempo real
RAD50	<i>RAD50 homolog (S. cerevisiae)</i>	--
RAR	<i>RAR-related orphan receptor C</i>	--

Ref	--	Referencia
RefSeq	Reference Sequence	--
RT-PCR	Retrotranscription polimerase chain reaction	Reacción en cadena de la polimerasa y retro-transcripción
Rb	Retinoblastoma	Retinoblastoma
Rb1L	retinoblastoma-like 1	--
RIF-1	RAP1 interacting factor homolog (yeast)	--
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	--
S	--	Síntesis
SAC	Spindle Assembly Checkpoint (SAC)	Punto de control del ensamblaje del huso
SAE1	SUMO1 activating enzyme subunit 1	--
SAE2	SUMO2 1 activating enzyme subunit 2	--
SAPE	Streptavidin Phycoerythrin	--
SCA	Subcluster A	--
SCB	Subcluster B	--
SCC	Subcluster C	--
SCD	Subcluster D	--
SCE	Subcluster E	--
SCF	Subcluster F	--
SCG	Subcluster G	--
SCH	Subcluster H	--
SCI	Subcluster I	--
SCJ	Subcluster J	--
SF-1	splicing factor 1.	--
SFN	Stratifin	--
SFRS18	Splicing factor, arginine/serine-rich 18	--
SLR	Signal low ratio	--
SMC2	structural maintenance of chromosomes 2--	--
SMC3	structural maintenance of chromosomes 3	--
SOS-1	Son of sevenless homolog 1	--
SSB	Single Stranded DNA	ADN de hebra simple
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier	--
Thr	--	Treonina
TFII	Transcription factor II	--
TFDP1	Transcription factor Dp-1 i	--
TLKs	Tousled-like kinases	--
TLK-1	Tousled-like kinase 1	--
TLK-2	Tousled-like kinase 2	--
TPM4	Tropomyosin 4	Tropomiosina 4
TNFR5	TNF receptor-associated factor 5	--
TOP2A	Topoisomerase 2A	Topoisomerasa 2A
TXIP	Thioredoxin interacting protein	--
UBA2	Ubiquitin-like modifier activating enzyme 2	--
UBA6	Ubiquitin-like modifier activating enzyme 6	--
UBE1L2	Ubiquitin-activating enzyme E1-like 2	--
UBE2D1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 1	--
UBE2K	Ubiquitin-conjugating enzyme E2K	--
Val	--	Valina
VGCCs	Voltage-gated calcium channels	--
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein	--
XRCCA	X-ray cross-complementing group A	--

1. INTRODUCCIÓN.

La enfermedad de Alzheimer y las prionopatías son dos enfermedades neurodegenerativas que constituyen en la actualidad un gran problema médico y socio-económico, es por ello que se destinan gran cantidad de recursos a la investigación de ambas patologías. Esta movilización de recursos tanto humanos como económicos está dirigida fundamentalmente a conocer los procesos patológicos subyacentes, así como al desarrollo de estrategias diagnósticas y terapéuticas efectivas. En la actualidad, numerosas evidencias ponen de manifiesto que ambos procesos neurodegenerativos comparten numerosas características desde un punto de vista neuropatológico, molecular y mecanístico aún cuando su etiología es claramente distinta. La posibilidad de un abordaje común en ambas patologías supondría la apertura de nuevas vías de investigación para la obtención de dianas terapéuticas hasta ahora no contempladas, lo que facilitaría el desarrollo de nuevos agentes farmacológicos que permitieran, si no la erradicación de las mismas, el retraso de su progresión en el tiempo.

1.1. Neuropatología y bases moleculares de la enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer es una de las causas de demencia más común en la edad adulta. Su incidencia ha aumentado de forma espectacular en la última década, de forma que mas de 25 millones de personas se ven afectadas en la actualidad por esta patología ⁽²¹⁰⁾. Según el informe mundial sobre la enfermedad de Alzheimer más de 35 millones de personas padecerán demencia en el 2011 y esta cifra se duplicará en los próximos 20 años, llegando a cifras de 65,7 millones en el año 2030 ⁽⁷⁰⁾. Esta enfermedad es el síndrome más frecuente en la población mayor de 65 años (1-5%), y su prevalencia aumenta en relación con la edad, pudiendo afectar en algunas poblaciones a un 30-40% de los mayores de 80 años ^(63, 255). Presenta distintas modalidades (familiar en el 5% de los casos o esporádica en un 95% de los mismos) ⁽²⁴²⁾ y en ella participan multitud de factores genéticos y ambientales, lo que dificulta cualquier intento de conocer las causas exactas y los mecanismos moleculares implicados en su desarrollo. La enfermedad se caracteriza por la aparición de una demencia progresiva y pérdida paulatina de las funciones mentales, y en particular aquellas relativas a la memoria, a funciones cognitivas ^(206, 230). Esta patología transcurre entre periodos de lucidez y demencia a lo largo de unos diez años como media, llegando en los últimos estadios de la misma a producir una incapacidad física y mental que hacen del paciente un individuo totalmente dependiente de sus cuidadores.

En 1907, Aloïs Alzheimer describió el primer caso de este desorden neuropsiquiátrico en una mujer de mediana edad, Auguste D que presentaba déficits de memoria, desorientación espacial y temporal, así como dificultades en la percepción. Ayudado de métodos histoquímicos, encontró que el cerebro de la mujer presentaba gran cantidad de lesiones tanto extracelulares como intracelulares. Estas lesiones, en la actualidad, sabemos que se corresponden con las placas neuríticas amiloides y con los ovillos neurofibrilares (NFTs), dos tipos de agregados proteicos característicos de esta patología.

Las placas amiloides, cuyo componente mayoritario es la proteína β -amiloide ($A\beta$) ^(83, 162), se depositan extracelularmente en el parénquima cerebral de determinadas áreas cerebrales implicadas en la memoria y el pensamiento abstracto, como el hipocampo, la amígdala, la corteza entorrinal y temporoparietal y algunos núcleos subcorticales que emiten proyecciones hacia el hipocampo y el neocórtex, lo que produce una pérdida masiva de neuronas que es acompañada de procesos de astrocitosis reactiva generalizada ^(230, 242). Igualmente, las placas se depositan alrededor de las paredes de los vasos sanguíneos, principalmente en los capilares y las arteriolas leptomeníngicas y corticales de los ganglios basales, el cerebelo y el hipocampo, produciendo lo que se conoce como angiopatía cerebral amiloidea. Ésta, lleva a la formación de aneurismas, necrosis fibrinoides y microangiopatías ⁽²¹²⁾. Los ovillos neurofibrilares se localizan en el citoplasma de aquellas neuronas que sufren los

procesos neurodegenerativos. Estos son agregados formados por pequeños filamentos apareados de 10 nm de diámetro, constituidos por la proteína tau hiperfosforilada y anormalmente plegada ⁽⁸⁹⁾.

Tanto las placas amiloides como los NFTs aparecen de forma invariable en el cerebro de pacientes con esta enfermedad, y aunque no se ha podido demostrar de forma concluyente una relación causal, se ha aceptado que estas estructuras podrían ser la causa principal de la misma; en particular y apoyado por evidencias presentadas por numerosos estudios, el desarrollo de la fisiopatología de esta enfermedad podría depender directamente de las placas seniles y de los procesos neurotóxicos desencadenados por las mismas ^(76, 183, 231, 232, 246, 256)

1.1.1. Descripción de la proteína precursora amiloide (APP) y la hipótesis de la cascada A β .

La hipótesis de la cascada A β fue planteada por primera vez por Glenner y Wong ⁽⁸³⁾, cuando tras la purificación y análisis de las placas amiloides observaron que ésta estaba fundamentalmente constituida por un péptido de 4 KDa, al que denominaron β -amiloide. Este descubrimiento fue posteriormente confirmado por otras investigaciones ^(214, 278).

El péptido β -amiloide consta de 40 ó 42 aminoácidos (A β 40-A β 42), siendo liberado anómalamente por la actuación secuencial de dos proteasas, las β y γ -secretasas, sobre una proteína precursora de mayor peso molecular, que se localiza en la membrana celular ⁽⁹¹⁾. APP es una proteína integral de membrana que pertenece a la familia de las glicoproteínas de transmembrana tipo I y se expresa de forma ubicua en distintos tipos celulares. La APP presenta un extremo aminoterminal que puede estar orientado hacia el exterior de la célula, o bien puede estar localizado en el lumen de vesículas como las del retículo endoplásmico, el aparato de golgi o de los endosomas intracelulares, y contiene un dominio de unión a heparina, otro dominio de unión a cobre y un dominio inhibidor de proteasas (Figura 1) ⁽²²⁾. El extremo carboxilo terminal por el contrario está orientado hacia el citoplasma. El péptido β -amiloide comprende 28 aminoácidos del dominio hidrofílico de juxtamembrana y de 10 a 15 aminoácidos del dominio hidrofóbico transmembranal de la APP ⁽¹⁰³⁾.

Esta proteína precursora presenta distintas isoformas que son obtenidas a partir del procesamiento alternativo de un único gen localizado en el cromosoma 21 ⁽²³¹⁾. Los distintos productos se identifican en base al número de residuos que presentan ⁽¹⁹³⁾. Las isoformas mayoritarias son la APP₆₉₅, la APP₇₅₁ y la APP₇₇₀. La APP₆₉₅ es la más abundante en el cerebro, se expresa principalmente en neuronas y en menor grado en la glía ⁽²³⁶⁾. Las isoformas APP₇₅₁ y la APP₇₇₀ se expresan sin embargo de forma ubicua en otros tejidos y presentan en su extremo aminoterminal un motivo de 56 aminoácidos que presenta homología con los inhibidores de proteasas tipo Kunitz (KPI) ^(151, 205) ⁽²⁰⁵⁾. La función de esta proteína aún no está clara, sin embargo se le han adjudicado muy diversas funciones, de forma que ésta podría participar en procesos de adhesión a proteínas de la matriz extracelular y en la preservación de la plasticidad sináptica ⁽³⁵⁾, o podría actuar como receptor de membrana participando en procesos de clasificación intracelular directamente asociada a la kinesina I ⁽¹¹⁹⁾ así como en la modulación de la expresión génica a través de la liberación de fragmentos proteicos como consecuencia de su propia hidrólisis por procesos de proteólisis de proteínas de transmembrana ⁽⁵⁵⁾ y también como proteína antiapoptótica controlando la activación de P53 a nivel post-traducciona ⁽²⁸²⁾, la migración neuronal ⁽²⁹²⁾ o la homeostasis del cobre ⁽²⁴⁸⁾.

Una vez sintetizada la APP en el retículo endoplásmico, sufre modificaciones a nivel post-traducciona, tanto N- y O-glicosilaciones ⁽²⁵⁸⁾, como fosforilaciones y sulfataciones ⁽¹⁹⁰⁾, en su paso por el sistema de Golgi. Tras estas modificaciones post-traduccionales, el precursor maduro es transportado hasta la membrana plasmática por medio de vesículas secretoras, y una vez allí puede sufrir dos procesamiento alternativos de proteólisis: el procesamiento no amiloidogénico y el procesamiento amiloidogénico. En el procesamiento no amiloidogénico la proteólisis de la APP se produce por una o varias enzimas que se denominan de forma genérica α -secretasas y

que cortan a la proteína en medio de la secuencia del péptido β -amiloide, liberando un fragmento aminoterminal soluble (APPs α con un tamaño entre 90-100 KDa, secretado al medio ^(93, 233) con función neurotrópica ⁽¹⁶⁴⁾, y un fragmento carboxilo terminal de 10 kDa (C83 o α CTF) ⁽¹⁷⁶⁾ que puede sufrir a su vez proteolisis por las γ -secretasas, liberándose un nuevo fragmento denominado p3 ^(64, 92) (Figura 1A).

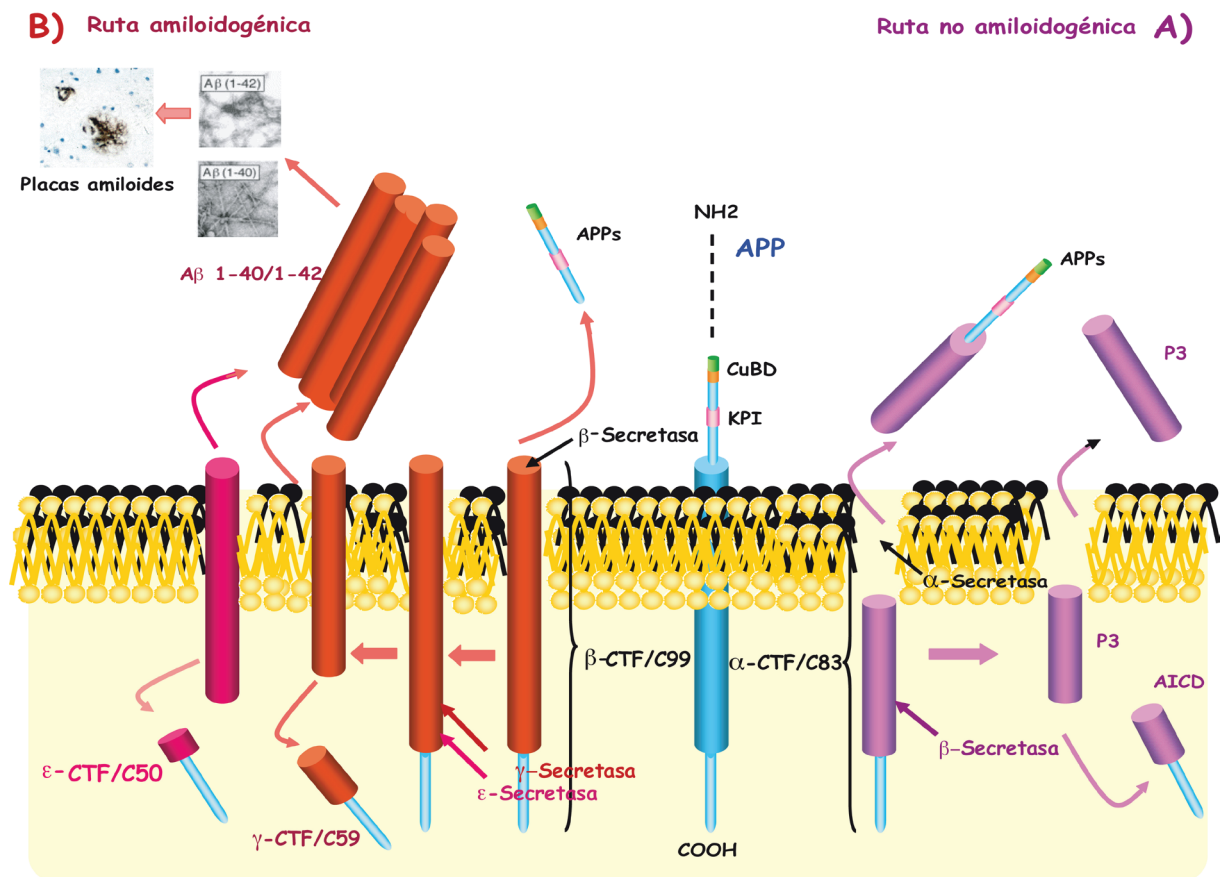


Figura 1. Procesamiento de la APP. En la figura se representan los dos tipos de procesamiento posibles que puede sufrir la proteína precursora amiloide (APP). La APP es una glicoproteína de membrana que presenta en el extremo aminoterminal un dominio de unión a heparina, un dominio de unión a cobre (CuBD) y un dominio inhibidor de proteasas tipo Kunitz (KPI). A) Procesamiento no amiloidogénico de la APP por el cual la proteína sufre la actuación secuencial de la α - y la γ - secretasas liberándose el fragmento soluble APPs- α y el fragmento carboxilotermino p3 y AICD respectivamente B) Procesamiento amiloidogénico de la APP por el cual la proteína sufre la actuación secuencial de las β - y γ -ó ϵ -secretasas liberándose el fragmento APPs- β , los fragmentos β -amiloides ($A\beta$

El procesamiento amiloidogénico es un proceso anómalo en el que la APP es cortada de forma secuencial por las β y γ -secretasas o ϵ -secretasas. La β -secretasa, también llamada BACE-1, es una aspartil proteasa que pertenece a la familia de las pepsinas, y corta a la proteína precursora en el extremo aminoterminal de la secuencia β -amiloide, liberando por un lado un derivado que es secretado (APPs β) y por otro lado el extremo carboxilotermino de la proteína que consiste en un fragmento de 99 aminoácidos (C99 o β CTF) con un tamaño de 12 KDa, C99 ^(94, 145, 148), a continuación puede ser hidrolizado en su dominio transmembrana por la γ -secretasa, complejo proteico heteromérico formado por cuatro proteínas diferentes: presenilina, nicastrina, PEN-2 y APH-1 ⁽⁹¹⁾ que puede actuar sobre los residuos 39 a 43 de la proteína, originando péptidos amiloides de distintos tamaños y con distinta capacidad de agregación ^(31, 130). Los más abundantes son el $A\beta$ 1-40 (péptido poco agregante) que se corresponde con un 90% del péptido total producido y el $A\beta$ 1-42 (péptido muy agregante), que se corresponde con el 10% restante ⁽¹⁷⁶⁾. Además de los péptidos amiloides es liberado un fragmento de menor tamaño denominado C59 o γ -CTF. Cuando C99 es hidrolizado por la ϵ -secretasa, se libera el fragmento ϵ -CTF o C50/AICD de 42-49 aminoácidos que también parece jugar un papel igualmente importante en el inicio y progresión de las patologías

neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer ^(180, 191, 263) o como regulador de la expresión de la proteína PrP implicada en las prionopatías ⁽¹²⁴⁾ (Figura1B).

La sobreproducción de la proteína β -amiloide o bien la ralentización en su degradación, llevan a la oligomerización de las distintas formas A β 40-A β 42 en un proceso en el que se dan mecanismos de polimerización dependientes de nucleación ⁽²⁴²⁾. Durante estos procesos se han detectado distintas formas intermedias desde la proteína nativa monomérica a las fibrillas que constituyen los agregados amiloides formados por estructuras β -laminas ⁽¹⁶⁾.

En estos procesos las formas iniciales son oligómeros solubles de bajo peso molecular (desde dímeros a decámeros) que se han encontrado tanto en el fluido cerebroespinal como en homogeneizados cerebrales humanos. Las formas intermedias son fibras cortas y flexibles con un tamaño de 100 nm, que se denominan protofibrillas. Estudios cinéticos han demostrado que éstas son formas intermedias metaestables cuya tasa de polimerización depende directamente de factores tales como la concentración, la temperatura, la fuerza iónica y el pH. Las protofibrillas que presentan un alto contenido en láminas se encuentran en un equilibrio dinámico con las formas oligoméricas solubles y son las precursoras directas de las fibras amiloides (Figura 2) ⁽²⁴²⁾.

Estudios estructurales mostraron que cuando se determinaba la estructura secundaria de los péptidos A β 40-A β 42 en pHs próximos a su punto isoelectrico, donde se impedía la formación de agregados, éstos presentaban una estructura en hélice α de forma predominante con solo algunos giros β . Ha sido ampliamente descrito que las fibras amiloides presentan un alto contenido de estructuras β -laminas ⁽¹⁷⁶⁾, lo que ha llevado a pensar que la existencia de un cambio conformacional previo al proceso de oligomerización es necesario para la formación de las placas amiloides ^(129, 166, 244). La amiloidosis sistémica producida por estos agregados en el espacio extracelular induce mecanismos de estrés físico y mecánico que causan daños axonales difusos, y en consecuencia muerte neuronal por apoptosis ⁽²⁶⁷⁾.

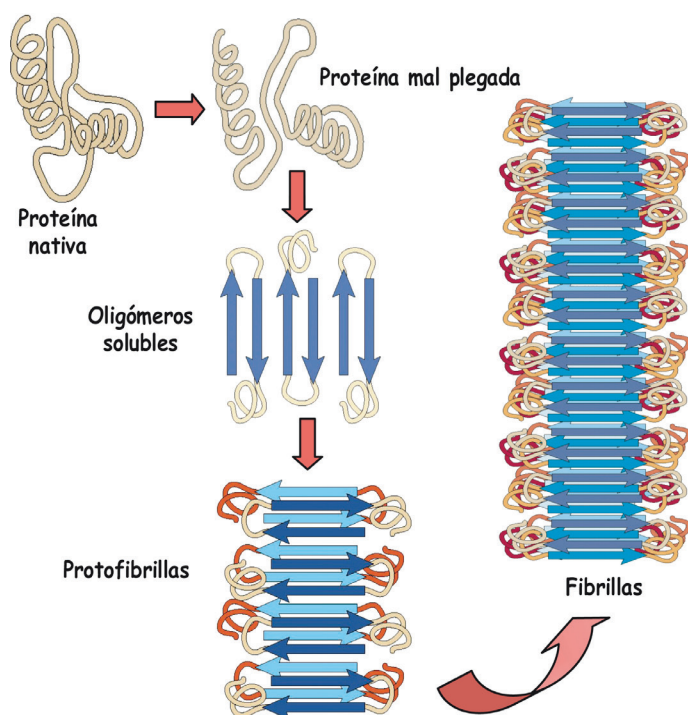


Figura 2. Proceso que lleva a la formación de proteínas mal plegadas y agregados amiloides. La proteína nativa correctamente plegada con estructura en hélice α sufre una transición estructural patológica por la cual se forma una proteína intermedia mal plegada que presenta una gran tendencia a formar agregados de estructuras en lámina β que dan lugar a protofibrillas y se unen, originando las fibrillas amiloides que se acumularán hasta formar los agregados.

1.1.2. Descripción de la proteína Tau y los ovillos neurofibrilares.

Los ovillos neurofibrilares (NFTs) están compuestos por matrices de filamentos apareados (PHFs) que están presentes fundamentalmente en el hipocampo, la corteza entorrinal y en la amígdala ⁽¹⁵⁶⁾. Los PHFs son estructuras anómalas que se generan por procesos de auto-agregación a partir de las formas hiperfosforiladas de la proteína tau, constituyendo auténticas redes proteicas compactas y filamentosas ^(155, 158).

Tau es una proteína multifuncional que se encuentra asociada a microtúbulos, y cumple diversas funciones tales como la estabilización de los microtúbulos frente a procesos de inestabilidad dinámica y actúa como molécula puente de los microtúbulos con otros filamentos del citoesqueleto ^(135, 223). En condiciones normales el equilibrio entre las fosforilaciones y defosforilaciones de tau modula la estabilidad del citoesqueleto y en consecuencia la morfología axonal espaciotemporal. Una de las modificaciones tempranas que ocurren en la enfermedad de Alzheimer es la hiperfosforilación de tau debido a la actuación de diversas proteínas quinasa, lo que produce cambios tanto conformacionales como estructurales en esta proteína. Estas modificaciones no son exclusivas de la enfermedad de Alzheimer, recientemente ha sido descrito cómo en algunas de las patologías incluidas dentro de las prionopatías como la variante transmisible de la enfermedad de Creutzfeld-Jakob y la enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker se encuentra la proteína tau fosforilada tanto en las neuritas como en la región perinuclear neuronal ⁽⁷⁹⁾. Estos cambios llevan a la formación de oligómeros y filamentos que contribuyen

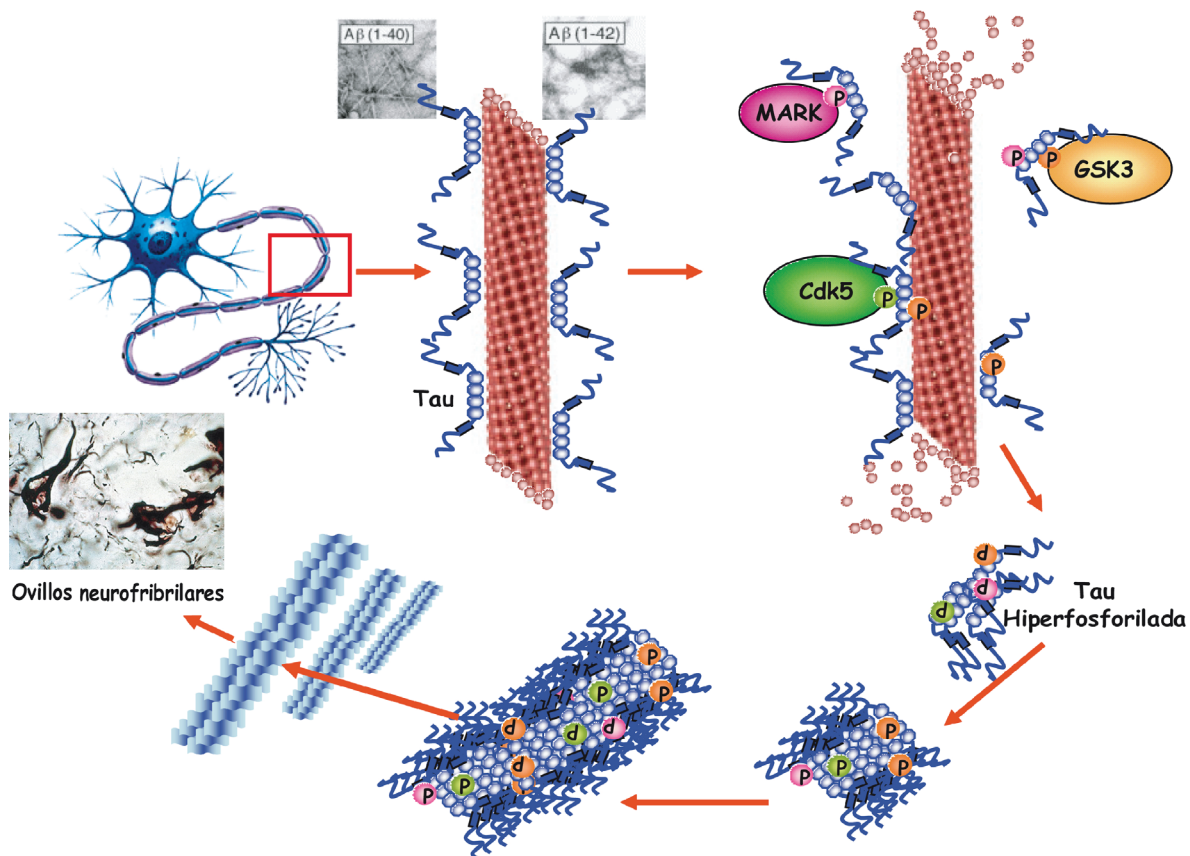


Figura 3. Cascada de eventos que promueven la aparición de los ovillos neurofibrilares. Los microtúbulos axonales (en rojo) participan en el transporte de las vesículas desde el soma neuronal hasta la sinapsis. La función de los microtúbulos está regulada por la proteína tau (en azul) a través de cuatro repeticiones en su dominio de unión a microtúbulos. La presencia de los péptidos amiloides lleva a la activación de diferentes quinases (MARK, Cdk5 y GSK3-β) que fosforilan a la proteína tau en los dominios de unión a microtúbulos produciendo su disociación de la superficie de los microtúbulos y desestabilizándolos, lo que conlleva una alteración del transporte vesicular. Por otro lado, la proteína tau hiperfosforilada se acumula y sufre procesos de agregación por los que se forman desde oligómeros hasta filamentos que se acumulan constituyendo los filamentos apareados (PHFs), que se depositan en forma de ovillos neurofibrilares.

a la generación de los PHFs y en consecuencia a la formación de los ovillos tan característicos de este proceso neuropatológico, alterándose su capacidad de unión a microtúbulos y viéndose afectado por tanto, el ensamblaje de los mismos (Figura 3) ^(155, 228). Las proteínas quinasa más relevantes implicadas en las modificaciones de tau son la GSK3 β ^(107, 108, 117) la Cdk5, quinasa que es activada por factores como p35 y p39 y está implicada tanto en la fosforilación de tau como en procesos de neurogénesis ^(6, 39, 185), las MAPK (*Mitogen activated proteína kinase*) ⁽²⁵⁰⁾ y las MARK (*Microtubule-Affinity Regulating Kinase*) ⁽⁴⁹⁾.

1.2. Neuropatología y bases moleculares de las prionopatías.

Las Prionopatías constituyen un conjunto de desórdenes neurodegenerativos entre los que se incluyen el *Scrapie* en ovejas, la Encefalopatía Espongiforme en vacas así como el Kuru y la enfermedad de Creutzfeld-Jakob en humanos ⁽²⁰⁷⁾ siendo esta última la que presenta una mayor incidencia dentro de este grupo de patologías, con aproximadamente entre uno y dos individuos afectados por millón y año ⁽²⁷⁵⁾. Al igual que en la enfermedad de Alzheimer, estas enfermedades presentan distintas modalidades (familiar en 8% de los casos, esporádicas en un 90% e infecciosas en un 2% de los mismos) ^(242, 243) y todas ellas implican la modificación de la proteína priónica (PrP), proteína presente de forma habitual en las células ⁽²⁰⁷⁾ y cuya modificación lleva a la aparición de una forma proteica patógena aberrante, resistente a proteasas, llamada PrP^{sc}. Esta proteína anómala se acumula extracelularmente en forma de fibrillas o placas amiloideas difusas, o bien intracelularmente en forma de fibras o varillas ^(30, 208, 209) tanto en el cerebro ⁽²⁶⁸⁾, como en el sistema ocular ⁽²⁹⁰⁾ y en los nódulos linfoides del bazo ⁽²³⁹⁾.

Los cambios patológicos asociados a estas enfermedades priónicas se observan principalmente en el sistema nervioso central, caracterizándose por una degeneración espongiforme del tejido nervioso, con pérdida neuronal acompañada de gliosis ⁽²⁷⁵⁾, lo que lleva a la aparición de un amplio espectro de síntomas clínicos, entre los que se incluyen demencia, ataxia, alteraciones psiquiátricas o insomnio ⁽²⁴²⁾.

1.2.1 Descripción de la Proteína priónica celular (PrP^c) y la proteína priónica patógena (PrP^{sc})

La PrP^c es una sialoglicoproteína de membrana codificada por el gen *Prpn* que está formada por 210 residuos aminoácidos y que presenta un tamaño de 33-35 KDa ^(75, 275). Ésta se encuentra anclada a la cara externa de la membrana plasmática a través de una molécula glicosil fosfatidil inositol (GPI) y puede ser liberada de la superficie celular tras la actuación de la fosfolipasa C que hidroliza específicamente grupos fosfatidil inositol (PIPLC). El PrP^c que es altamente susceptible a la digestión con proteinasa K ⁽²⁷⁵⁾ presenta distintos dominios: el extremo aminoterminal que incluye a los 120 primeros aminoácidos de la proteína y se encuentra claramente desestructurado, de forma que sólo presenta dos estructuras β -laminares y una hélice α de pequeño tamaño y el dominio carboxilterminal que está constituido por un dominio globular formado por dos hélices α de gran tamaño unidas por puentes disulfuro y que contiene dos oligosacáridos unidos en dos asparaginas en la posición 197 y 181 ^(46, 56) (Figura 4A). Esto hace que la PrP^c contenga en torno a un 40% de estructura en hélice α y una pequeñísima proporción de estructura en lámina β ⁽²⁰⁸⁾.

La PrP^c se expresa de forma abundante en numerosos tejidos y especialmente en el cerebro, sobre todo en el estrato radial y oriental de la región CA1 del hipocampo ⁽²⁰⁸⁾, tanto de humanos como de animales, lo que pone de manifiesto que debe estar implicada en funciones fisiológicas importantes. Aunque se desconoce su función exacta, se ha postulado que podría actuar como un correceptor en la superficie celular, transduciendo señales de supervivencia a través de la activación de las quinasas ERK1/2, la PKA y la PI3K, evitando la muerte

por apoptosis^(104, 276) mediante la inhibición de Bax^(102, 136, 215) o bien podría actuar como una superóxido dismutasa en procesos de oxido-reducción^(24, 136, 296). Igualmente se ha descrito que podría contribuir al mantenimiento del entorno inmunológico⁽¹⁸⁴⁾ y se le han asignado funciones biológicas que afectarían a procesos de señalización y transmisión sináptica⁽²⁷⁶⁾.

La proteína PrP^{sc}, la forma patógena de la PrP^c, se origina a partir de un reordenamiento estructural de la isoforma celular normal a través de un proceso autoreplicativo post-traducciona que probablemente ocurre en el interior de los endosomas^(20, 29, 238). A pesar de tener la misma secuencia aminoacídica que la proteína celular normal, su estructura secundaria y terciaria es diferente, produciendo profundos cambios en sus propiedades fisicoquímicas⁽²⁰⁹⁾. Esta isoforma se caracteriza por ser resistente a la hidrólisis por distintas proteasas como la tripsina, sin embargo y al contrario de lo que ocurre con la forma PrP^c sólo es parcialmente hidrolizada por la proteinasa K, originando distintas especies (mono- y biglicosiladas o no glicosiladas) con movilidades electroforéticas diferentes denominadas de forma conjunta PrP 27-30. Este núcleo resistente a la hidrólisis por proteasas, tiene la capacidad de polimerizar en pequeñas fibrillas de distintos tamaños que son indistinguibles de otras estructuras amiloides desde el punto de vista ultraestructural y de tinción. Estudios de espectroscopía de infrarrojos y de dicroísmo circular han permitido demostrar que esta capacidad de polimerización reside en el alto porcentaje de estructuras

A)

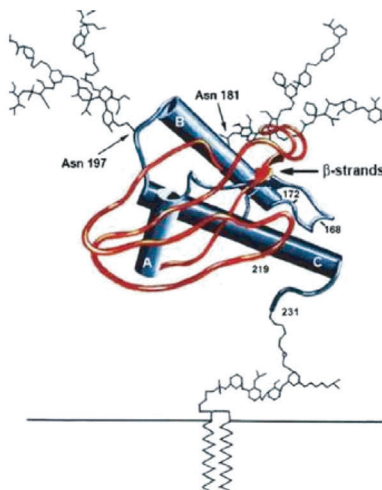
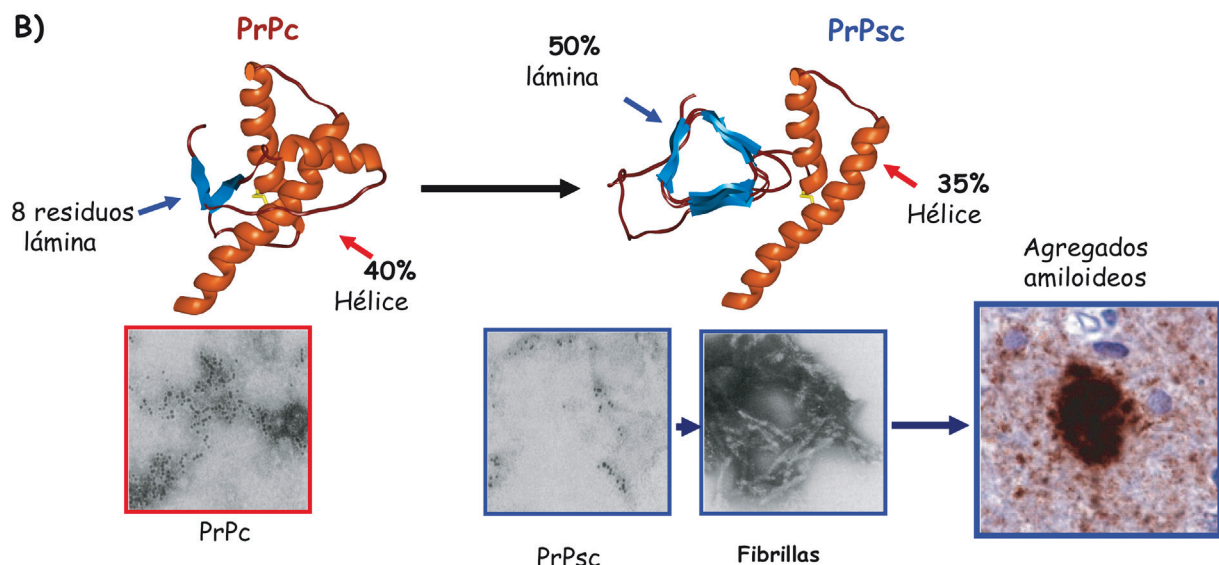


Figura 4. Modelo de la estructura secundaria del PrP^c. **A)** La proteína PrP^c se encuentra anclada a la membrana mediante una molécula GPI (glicosil fosfatidil inositol) y presenta dos dominios. El dominio aminoterminal está ampliamente desestructurado, de forma que sólo presenta dos estructuras β -laminares y una hélice α de pequeño tamaño (hélice A), mientras que el extremo carboxilo terminal presenta dos hélices α de gran tamaño (hélice B y C) unidas entre sí por puentes disulfuro y presentan oligosacáridos unidos en dos asparaginas en las posiciones 179 y 181. **B) Cambio conformacional de PrP^c a PrP^{sc} y proceso de oligomerización que lleva a la formación de los agregados amiloides.** La proteína PrP^c que presenta un 40% de estructura en hélice α y un bajo porcentaje de estructura β -laminar en el extremo carboxiloterminale sufre una transición estructural a partir de la cual se origina la proteína anómala PrP^{sc}. Durante este cambio se origina la nueva isoforma caracterizada por presentar hasta un 50% de su estructura en lámina β , lo que contribuye a la generación de procesos de oligomerización a partir de los cuales se crean, inicialmente las fibrillas y a continuación los agregados amiloides.

B)



β -laminas presentes en la estructura secundaria del PrP 27-30 con un 50% de estructuras en lámina β y tan sólo un 35% de estructuras en hélice α lo que facilita la generación de agregados amiloides ⁽¹⁹⁴⁾ (Figura 4B). Las regiones cerebrales en las que se acumula la isoforma PrP^{sc} son distintas a aquellas en las que se encuentra la isoforma PrP^c y es más, en aquellas regiones en las se detecta la isoforma PrP^{sc} no se detecta la proteína celular normal. Así PrP^{sc} se distribuye en el núcleo habenular medial, los núcleos septales medios, la banda diagonal del área de Broca así como en los axones mielinizados. Estas pruebas sugieren que los priones son transportados a lo largo de los axones siguiendo un modelo de migración de acuerdo con el transporte retrógrado ⁽²⁰⁸⁾.

En la prionopatías, al igual que en la enfermedad de Alzheimer, las proteínas mal plegadas, que surgen como resultado de fuertes cambios conformacionales, son inestables en el medio acuoso por exponer en la superficie sus segmentos hidrofóbicos, por lo que tienden a estabilizarse mediante la creación de interacciones moleculares con otros segmentos proteicos equivalentes, formando pequeños oligómeros con estructura en lámina β que poco a poco va creciendo mediante en proceso de polimerización dependiente de nucleación hasta producir las fibrillas que se acumulan dando lugar a los agregados amiloides (Figura 4B) ⁽²⁴²⁾.

1.3. Mecanismos de muerte neuronal en la enfermedad de Alzheimer y en las Prionopatías.

Tanto la enfermedad de Alzheimer como las Prionopatías se caracterizan por pérdida neuronal selectiva, alteraciones sinápticas y procesos neuroinflamatorios (astrocitosis reactiva y activación de la glía). Esta pérdida neuronal, que ocurre como consecuencia del plegamiento proteico anómalo y la agregación, transcurre con muerte celular programada ⁽¹⁵³⁾. Se han propuesto tres hipótesis que permiten establecer una relación entre los procesos de plegamiento proteico anómalo, la agregación y la muerte neuronal por apoptosis: 1) pérdida de función de la proteína nativa 2) adquisición de nuevas funciones neurotóxicas por las proteínas mal plegadas y 3) activación directa de la microglia y de los astrocitos por parte de los agregados amiloides ⁽²⁴²⁾.

1.3.1. Hipótesis de la pérdida de función de la proteína nativa.

Esta hipótesis contempla la posibilidad de que los procesos neurodegenerativos estén causados por la pérdida de función de la proteína nativa, cuando ésta sufre la transición conformacional durante el plegamiento anómalo y el posterior proceso de agregación ⁽²⁴²⁾. Como se ha explicado anteriormente tanto la PrP^c como la APP son glicoproteínas de membrana que presentan funciones neurotróficas, de forma que su ausencia podría desencadenar la pérdida neuronal selectiva tan característica de estos procesos. Así, la no inhibición de Bax o la falta de función como superóxido dismutasa por parte de PrP^c, podría llevar a la muerte neuronal, bien por el desencadenamiento directo de la apoptosis o bien por la aparición de cambios en la homeostasis de iones metálicos como el Cu²⁺ y el Zn²⁺ que llevarían a la formación de radicales libres de oxígeno y a la consiguiente neurodegeneración. De la misma forma, la pérdida de las actividades antiapoptóticas descritas para la APP en su función del control de P53 a nivel post-traducciona l o bien su ausencia como molécula neurotrófica podrían desembocar en procesos similares.

1.3.2. Hipótesis de la adquisición de nuevas funciones neurotóxicas.

Esta hipótesis quizás es la más aceptada en la actualidad como explicación de los procesos neurodegenerativos. En ella se propone que el plegamiento anómalo y la agregación contribuyen a la aparición de proteínas con una nueva estructura conformacional que les proporciona funciones neurotóxicas, de forma que son los propios agregados los que inducen la muerte neuronal por apoptosis. Esta hipótesis se ha visto apoyada por numerosos estudios en los que se ha observado cómo pequeños fragmentos de las proteínas mal plegadas

inducen directamente la muerte neuronal tanto *in vitro* como *in vivo* ^(136, 253). Los agregados extracelulares pueden activar rutas de transducción de señal que llevan a la apoptosis mediante la interacción con receptores específicos, como los receptores RAGE (receptores para productos finales de glicosilación avanzada) que son capaces de unirse a fibras amiloideas formadas tanto por A β como por PrP^{sc}, induciendo estrés celular y la activación de NF κ B ⁽²⁸³⁾ o como el receptor de baja afinidad para neurotrofinas p75NTR ⁽³⁴⁾. Recientes estudios han puesto en evidencia que no sólo las estructuras mal plegadas podrían ser responsables de la neurotoxicidad sino que pequeñas estructuras oligoméricas podrían inducir la muerte celular, incluso de forma más potente que los agregados ya que estas pequeñas moléculas podrían difundir entre las brechas sinápticas contribuyendo más fuertemente a la disfunción sináptica ⁽⁹⁰⁾. De la misma forma, estos pequeños oligómeros pueden interferir con las rutas de señalización intracelular afectando de forma irreversible a la viabilidad neuronal y en consecuencia a la plasticidad sináptica ^(19, 243). Otro mecanismo por el cual el péptido β -amiloide y el PrP^{sc} podrían inducir la neurotoxicidad sería mediante procesos de desorganización y despolarización de membrana mediados por la formación de canales iónicos, lo que resultaría en una dishomeostasis iónica y en una alteración de la regulación en la transducción de señales que llevaría a la muerte neuronal ⁽²⁵⁾. El último mecanismo de inducción de muerte celular propuesto sería mediante la generación directa de estrés oxidativo por los propios agregados amiloideos, lo que desembocaría en un aumento de los radicales libres de oxígeno resultando en la oxidación de lípidos y proteínas, en un aumento de los niveles intracelulares de calcio y finalmente en una disfunción mitocondrial ⁽¹³⁾.

1.3.3. Hipótesis de la inflamación.

En esta hipótesis los agregados proteicos anómalos causarían procesos de inflamación crónica que llevarían a la aparición de cambios sinápticos y a la muerte neuronal ^(165, 279). Existen evidencias de que se produce una inflamación crónica en ambos procesos neurodegenerativos, que se caracteriza por la aparición de astrocitosis y activación de la microglia, especialmente en aquellas regiones próximas a los depósitos proteicos ^(16, 179). Se ha observado que se produce una acumulación específica de proteínas inflamatorias en los agregados amiloideos, entre las que se incluyen proteínas del complemento, inhibidores del complemento, proteínas de fase aguda, citocinas inflamatorias, proteasas e inhibidores de proteasas. Igualmente proteínas inflamatorias como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento han sido encontradas aumentadas en el cerebro de pacientes afectados por estas patologías ^(165, 280). En contra de lo apuntado en diferentes estudios epidemiológicos, también se han descrito estudios *in vitro* en los que se sugiere que la neurotoxicidad del péptido amiloide podría inducirse directamente sobre la neurona, incluso en ausencia de glia ^(48, 73, 87).

1.4. Utilización de péptidos sintéticos en modelos de neurotoxicidad: A β 25-35 y PrP106-126.

Desde un punto de vista patológico, es interesante observar que neuropatías con etiologías tan distintas como la enfermedad de Alzheimer, o la enfermedad de Creutzfeld-Jakob, presenten sin embargo un alto índice de coincidencias. Las dos enfermedades presentan modalidades clínicas distintas (familiar y esporádica) y su patología se caracteriza por pérdida neuronal y alteraciones sinápticas. Por otro lado, ambas podrían ser consideradas como “desórdenes asociados a cambios conformacionales proteicos”, ya que en ambos casos el componente mayoritario de los depósitos cerebrales está constituido por proteínas anormalmente plegadas, con una proporción elevada de estructuras β laminares, originadas (bien por procesamiento enzimático anómalo, bien por alteración conformacional) a partir de glicoproteínas de membrana que en su estado natural poseen una función neurotrófica. En ambos desórdenes se produce además la aparición de PHFs constituidos por la proteína

tau fosforilada y el alelo *APOE* disminuye el riesgo de sufrir las variantes genéticas de ambas patologías ⁽¹⁹⁹⁾. Desde el punto de vista genético existe una asociación significativa del *PRPN* en homocigosidad para la variante Met129Val con la enfermedad de Alzheimer. De la misma forma estudios de asociación utilizando miles de SNPs han permitido describir cómo diversos *loci*, previamente asociados a la enfermedad Creutzfeld-Jakob, confieren igualmente riesgo de sufrir la enfermedad de Alzheimer ⁽⁹⁰⁾. Otra similitud a tener en cuenta en ambas patologías es la función del PrP^c como receptor tanto para el péptido Aβ 1-42 ⁽⁹⁰⁾ como para el PrP^{sc} ⁽²¹³⁾ produciendo alteraciones en la plasticidad sináptica y pérdida neuronal selectiva ^(66, 141) que se podrían explicar por la ausencia de función de las proteínas celulares nativas, por el desencadenamiento de una reacción inflamatoria crónica tras la activación directa de la microglia y los astrocitos por los agregados proteicos anómalos, o por la adquisición de funciones neurotóxicas por las proteínas mal plegadas. Con el fin de simular la toxicidad asociada a cada una de las proteínas neurotóxicas Aβ 1-42 y PrP^{sc} ha sido común la utilización de péptidos sintéticos como el Abeta 1-42, el Aβ 25-35 y el PrP106-126 respectivamente.

1.4.1. Aβ 25-35.

El Aβ 25-35 constituye el fragmento de menor tamaño procesado *in vivo* por las proteasas cerebrales ⁽¹³⁹⁾ y corresponde con la región biológicamente activa del péptido completo Aβ 1-42 y se caracteriza por constituir la fracción más neurotóxica y fibrillogénica del mismo además de mantener niveles significativamente elevados en su capacidad de agregación respecto al péptido completo ⁽³²⁾. En la actualidad este péptido es sintetizado, purificado y utilizado de forma frecuente como modelo en el estudio a nivel molecular de la enfermedad de Alzheimer.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la existencia de una clara correlación entre la estructura en agregados del Aβ 25-35 y su efecto neurotóxico. De hecho son varias las regiones que confieren las características conformacionales al péptido Aβ 1-42 facilitando los procesos de agregación y neurotoxicidad ⁽²⁴⁰⁾. El Aβ 25-35 corresponde con una fracción hidrofóbica del extremo carboxilterminal del péptido Aβ y parece ser fundamental tanto para la estabilización estructural de los agregados como para su insolubilidad. Estas características vienen fundamentalmente determinadas por la presencia de una metionina en la posición 35 (Met³⁵). Cuando ésta es sustituida por otro residuo aminoacídico como la Norleucina (Nleu) o bien es oxidada, se produce una clara disminución tanto en la agregación como en la capacidad neurotóxica del péptido, indicando por tanto la gran importancia de este residuo en el proceso de neurotoxicidad. Además de la Met³⁵, existen otras regiones que contribuyen al ensamblaje, plegamiento y estabilidad de los agregados. Entre ellas se encuentran una región localizada en la posición 25-29 que constituye un giro tipo β y contribuye al plegamiento y estabilidad durante el ensamblaje de los péptidos Aβ y dos Isoleucinas (Ileu³¹ e Ileu³²) que también contribuyen a su ensamblaje y favorecen la aparición de estructuras β-laminares facilitando entonces los procesos de agregación ^(32, 172, 200).

De la misma forma que se ha demostrado el efecto neurotóxico del Aβ 25-35 formando de parte agregados proteicos, son recientes los estudios que ponen de manifiesto un efecto neurotóxico de las formas solubles no agregadas del péptido β-amiloide. El efecto neurotóxico de las formas solubles contribuiría a la patofisiología de la enfermedad de Alzheimer alterando las funciones neuronales en los primeros estadios del proceso patológico, precediendo a la formación de los agregados y las placas amiloideas ^(262, 286). En estos estudios se describe cómo el péptido Aβ 25-35 tras internalizarse en la célula interactúa con la membrana mitocondrial interna y probablemente interfiere con algunas deshidrogenadas implicadas en la producción de NADH que forman parte del complejo I de la cadena transportadora de electrones induciendo la hinchazón y ruptura de la mitocondria y en consecuencia la muerte desencadenada por la vía apoptótica. La hinchazón de la mitocondria ocurre tras la aparición del poro

permeable de transición mitocondrial (PTP) lo que resulta en una pérdida del potencial de membrana mitocondrial ⁽³²⁾. En la formación del PTP podría estar implicada la Met³⁵ del péptido Aβ 25-35, en estado reducido podría incrementar los niveles de radicales hidroxilo, altamente reactivos, lo que tendría como consecuencia la apertura del poro ⁽¹⁴⁹⁾. De la misma forma Aβ 25-35 podría inducir la neurotoxicidad actuando como agente reductor capaz de modificar el estado oxidativo del hierro e interfiriendo así en la integridad de la membrana mitocondrial ⁽³²⁾.

1.4.2. PrP106-126.

El péptido sintético PrP106-126 corresponde a los residuos 106-126 de la proteína priónica humana y es capaz de inducir astrogliosis, siendo altamente neurotóxico y fibrillogénico tanto *in vitro* como *in vivo* ^(75, 140). Este péptido contiene una secuencia palindrómica AGAAAAGA altamente amiloidogénica que comprende desde las posiciones 113 a la 120 ^(23, 251). Ésta es una secuencia adyacente a la primera de las dos estructuras en lámina β de la PrP^c y es una región altamente hidrofóbica que presenta gran plasticidad estructural. El PrP106-126 mimetiza el efecto de PrP^{sc}, tiene un alto contenido en estructura β-laminar, presenta resistencia a proteasas, tendencia a agregarse en fibrillas y es tóxico para las células neuronales induciendo su muerte por apoptosis ^(74, 115). Por otra parte ha perdido su capacidad infecciosa lo que facilita enormemente su uso. Este péptido se caracteriza por presentar dos regiones estructurales opuestas, una hidrofílica y otra hidrofóbica que le confieren su capacidad de interactuar con la membrana plasmática aumentando su viscosidad a nivel microscópico, lo que origina alteraciones tanto en la homeostasis iónica como en la función de receptores dependientes de Ca²⁺ ⁽¹³⁶⁾.

Las peculiaridades físico-químicas de este péptido se concentran en el segmento aminoterminal, presentando un papel determinante en su resistencia a proteasas y durante la conversión conformacional. Este péptido sintético adopta distintas estructuras secundarias en función de las características del entorno en el que se encuentra (pH y fuerza iónica). El PrP106-126 presenta el tamaño suficiente como para conservar las principales características de la proteína priónica completa. Este péptido es altamente hidrofóbico y está cargado positivamente debido a la presencia de dos lisinas y una histidina que le proporciona una naturaleza anfipática. Su carga neta puede variar con el pH debido al estado de ionización de la Histidina 111, presentando una carga neta +2 a pH>7 y de +3 a pH < 6. La presencia de estas cargas positivas es lo que facilita la aparición de puentes salinos que pueden estar implicados en la formación de canales ⁽¹³⁶⁾. De la misma forma se ha observado que el PrP106-126 está constituido fundamentalmente por estructuras β-laminares a pHs ácidos ⁽⁴⁵⁾, lo que facilita el proceso de polimerización durante la formación tanto de estructuras fibrilares como de agregados amiloides.

La citotoxicidad del péptido reside tanto en su capacidad para formar canales iónicos así como en la de interactuar con los componentes de la membrana celular (lípidos y proteínas) induciendo cambios tanto en la permeabilidad de membrana como en los gradientes iónicos existentes a través de la misma ⁽¹³⁶⁾.

1.5. La genómica funcional como herramienta en el estudio del Alzheimer y las prionopatías.

La situación en la que se encuentra una célula depende en gran medida de numerosos procesos reguladores y de la expresión simultánea de un gran número de genes, es por ello que el estudio de una o varias moléculas en particular proporciona poca información sobre la situación de la célula en un contexto determinado, tanto fisiológico como patológico. Por ello, para llegar a un mejor conocimiento de cualquier proceso es necesaria la utilización de métodos capaces de aportar información global, métodos que permitan tener una visión más amplia de todos los cambios que se están produciendo como resultado de un determinado

proceso.

En respuesta a la necesidad de una comprensión global de los procesos biológicos se han desarrollado métodos de análisis masivo que permiten el estudio en paralelo de numerosas moléculas, incluso de todos los mensajeros de un organismo. Entre estos métodos se encuentra la hibridación de *microarrays* ⁽⁷²⁾ que permite el análisis simultáneo de la expresión de aquellos genes que se transcriben a ARNm bajo unas determinadas condiciones experimentales, fisiológicas o patológicas. Son numerosos los estudios que han empleado este abordaje con el fin de dilucidar los mecanismos patofisiológicos subyacentes tanto en la enfermedad de Alzheimer como en las prionopatías ^(18, 51, 78, 80, 125, 132, 161, 171, 225, 226).

Para la identificación de genes y rutas implicados en los procesos neurotóxicos inducidos tanto por el A β 25-35 como por el PrP^{Sc}106-126 en un modelo neuronal, se emplearon por tanto *microarrays* de ADN, que permiten analizar de forma rápida y simultánea miles de transcritos, proporcionando una información precisa sobre los cambios inducidos en la expresión relativa de los mismos. De esta forma se puede determinar el grado de similitud en las variaciones de expresión génicas aparecidas como consecuencia de la toxicidad inducida por cada uno de los péptidos.

En vista a las similitudes que presentan ambos desórdenes, se puede especular con que la toxicidad inducida tanto por los depósitos de péptido β -amiloide, como por los de PrP^{Sc} podría implicar mecanismos similares en ambas patologías, de forma independiente a su etiología. De acuerdo con esta hipótesis, en este trabajo se trata de caracterizar y estudiar *in vitro* el perfil de expresión génica inducido tanto por los priones, como por los péptidos β -amiloides, en un modelo neuronal humano y en ausencia de glía, tratando así de discernir aquellos procesos mecanísticos directamente asociados al efecto neurotóxico inducido por ambas proteínas. Con ello se trata de encontrar posibles redes de regulación génica y rutas de señalización alteradas de forma común en los dos procesos patogénicos así como la profundización en las bases moleculares de ambas enfermedades. En el caso de encontrar vías de actuación común, podría abrirse un nuevo e interesante campo terapéutico, en el que se abordarían una serie de genes como dianas terapéuticas comunes en ambas enfermedades y más aún, cabría plantearse el hecho de que estas pudieran también verse alteradas en otras patologías que también cursan con la aparición de agregados proteicos véase la enfermedad de Parkinson, Huntington, la diabetes mellitus tipo II, la esclerosis lateral amiotrófica o la polineuropatía amiloide familiar ^(53, 122, 142, 254).

2. OBJETIVOS.

- Optimización y validación de la toxicidad de los péptidos A β 25-35 y PrP106-126 como modelos de neurotoxicidad.
- Caracterización *in vitro* de los perfiles de expresión asociados a la toxicidad inducida por los péptidos amiloides A β 25-35 y PrP106-126 en un modelo exclusivamente neuronal, que permita caracterizar los procesos mecanísticos directamente asociados a la toxicidad de A β 25-35 y PrP106-126 en ausencia del contexto inflamatorio mediado por la glia.
- Integración funcional de los perfiles de expresión génica para los péptidos A β 25-35 y PrP106-126 en anotaciones biológicas y moleculares que permitan encontrar posibles redes de regulación génica y rutas de señalización, con los que ahondar en las bases moleculares de ambos procesos patogénicos, así como posibles nuevas relaciones transduccionales desencadas como consecuencia de la exposición a cada uno de los péptidos.
- Evaluación de la robustez de los datos obtenidos a partir de *microarrays* de expresión en relación a plataformas alternativas como la PCR en tiempo real. Determinación de la utilidad de los *microarrays* de expresión en la comprensión global de un determinado contexto fisiológico o patogénico.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Materiales.

3.1.1 Productos.

Productos químicos.

Los reactivos y productos de uso habitual en el laboratorio fueron suministrados por las siguientes casas comerciales: Amresco, Boehringer Mannheim, Carlo Erba, Falcon, Fluka, Gibco, Merck, Millipore, Promega, Riedel de Haën, Serva, Biorad, Calbiochem y Sigma-Aldrich.

Productos de Biología Molecular y Celular.

El *Cell Proliferation kit (MTT)* (Ref. #1465007) y el *In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* (Ref. #1684795) fueron proporcionados por Roche (Barcelona). La camptotecina (Ref. #C9911) fue adquirida a Sigma-Aldrich. (Madrid). El *BCA protein assay kit* (Ref. #23209) fue adquirido en *Pierce (Madrid)*. La membrana de nitrocelulosa *PROTRAN* (Ref. #10401196) fue adquirida a Whatman Schleicher&Schuell Bioscience, (Barcelona). El ECL (Ref. #RPN2209) se compró a Amersham Biosciences (Barcelona). El *GeneChip Expression 3'-Amplification Reagents One-Cycle cDNA Synthesis Kit* (Ref. #900431), el *GeneChip Expression 3'-Amplification Reagents for IVT labeling kit* (Ref. #900449) y el *GeneChip Sample Cleanup module Kit* (Ref. #900547) fueron adquiridos a Affymetrix (Reino Unido). El Suplemento N2 (Ref. #17502048), la solución de penicilina-estreptomicina (Ref. #0912), la glutamina (Ref. #25030-024), Tripsina-EDTA (Ref. #25300) la *DNAasa I Amplification grade* (Ref. #18068015), el Oligo dT (Ref. #18418-012) y la *Superscript II Reverse Transcriptase* (Ref. #18064-022), fueron obtenidos de Invitrogen (Barcelona). El *Rnasin Ribonuclease inhibitor* (Ref. #N22111) se compró a Promega (Madrid) y el *Brilliant SYBR Green QPCR master mix* (Ref. #600548) fue adquirido a Stratagene (Madrid). El *TRI-Reagent* (Ref. #79424) se adquirió a Sigma-Aldrich (Madrid) y el *Kit RNeasy Total Isolation Kit* (Ref. #74104) y el *RNAase-Free DNase Set* (Ref. #79254) a QIAGEN (Madrid).

3.1.2 Anticuerpos.

PARP (H-250): Anticuerpo policlonal que reconoce a los aminoácidos 764-1014 del extremo carboxilo terminal, perteneciente a la Poli-ADP Ribosa polimerasa de origen humano. Permite la detección de dos fragmentos de 112 y 85 KDa, una vez que ésta ha sido hidrolizada. (Ref. #sc-7150) *Santa Cruz*.

Caspasa 3 hidrolizada (Asp175): Anticuerpo policlonal que permite la detección de los niveles endógenos, del fragmento de 17/19 KDa, liberado tras la hidrólisis de la caspasa 3 en el residuo Asp175, tanto de origen humano, como de ratón y rata. (Ref. #9661) *Cell Signaling technology*.

Anticuerpos secundarios: Anti IgG de conejo (Ref. #sc-2030), anti IgG de cabra (Ref. #sc-2056) y anti IgG de ratón (Ref. #sc-2005). *Santa Cruz*

3.1.3 Líneas celulares

SH-SY5Y: Sublínea de neuroblastoma humano originada a partir de la línea celular SK-N-SH. Procede de una metástasis en médula ósea y fue obtenida de la *American Type Culture collections*. EE.UU. (Ref. ATCC #CRL-2266).

3.1.4 Péptidos

PrP106-126: El péptido corresponde a los aminoácidos 106-126, de la proteína PrP^c y presenta la siguiente secuencia: H-Lys-Thr-Asn-Met-Lys-His-Met-Ala-Gly-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly-OH. Éste fue adquirido a NeoMPs (Ref. #SC1382) Strasbourg, Francia.

EIAβ 25-35: El péptido corresponde a los aminoácidos 25-35 del péptido Aβ 1-42 y presenta la siguiente secuencia: H-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-OH Este fue adquirido a Anaspec (Ref. #24228) San José, California, EE UU.

3.2 Métodos.

3.2.1 Cultivos celulares

La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y fue cultivada en RPMI con un 10% de suero bovino fetal, penicilina (10000U/ml), estreptomina (10000 µg/ml) y glutamina 2mM, en 5% de CO₂ y a 37°C. Una vez las células estaban subconfluentes, se disociaron usando tripsina/EDTA, y se plaquearon 48 horas antes de llevar a cabo los tratamientos. 24 horas antes de realizar los mismos, éstas se mantuvieron en ausencia de suero en RPMI con Suplemento N2, penicilina (10000U/ml), estreptomina (10000 µg/ml) y glutamina 2mM, en 5% de CO₂ y a 37°C. Los tratamientos se realizaron mediante la adición de los distintos factores disueltos y/o envejecidos en el mismo medio sin suero.

3.2.2. Preparación y agregación de los péptidos Aβ 25-35 y PrP106-126.

El péptido Aβ 25-35, fue disuelto en agua desionizada a una concentración 2,5 mM para facilitar el proceso de agregación del péptido ⁽²⁰⁰⁾ y fueron almacenados a -80°C hasta su utilización.

El péptido PrP106-126 fue disuelto en PBS NaCl 200 mM, pH 5,5 ó pH 7,0 a una concentración 2 mM para facilitar su agregación. Finalmente este fue envejecido durante 48 horas a temperatura ambiente con agitación continua para provocar el proceso de fibrillogénesis ⁽⁴⁵⁾.

3.2.3 Ensayos TUNEL (Terminal deoxynucleotide transferase-mediated d UTP Nick end-label).

Células SH-SY5Y se cultivaron 48 horas antes de recibir el tratamiento, en placas de 24 multipocillos y utilizando como soporte cubres de 12 mm de diámetro. Una vez fue realizada la incubación con los distintos péptidos las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% preparada en PBS (pH 7,4) durante una hora a temperatura ambiente. A continuación se realizó un lavado con PBS y se incubaron todas las muestras con una solución de permeabilización (Tritón-X-100 al 0,1% preparado en citrato sódico al 0,1%) durante dos minutos en hielo (2-8°C). Realizada la permeabilización, a continuación se lavaron las muestras de nuevo con PBS, se secaron ligeramente y se añadió la mezcla de reacción tunel que incluye la enzima TdT (Terminal deoxinucleotidil transferasa) y una mezcla de nucleótidos marcados con fluoresceína. Añadida la mezcla de reacción, ésta se incubó en atmósfera húmeda y en oscuridad durante una hora a 37°C. Finalmente, se realizaron tres lavados consecutivos con PBS y se dejaron secar las muestras, para montarlas con el medio de montaje Vectashield que incluye DAPI (4',6 diamidino-2-phenylindole). Las muestras se analizaron por microscopia de fluorescencia con un microscopio Axiophot de Zeiss (Alemania) con longitudes de onda de excitación en el rango de 450-500 nm para la fluoresceína, y en el rango 345-360 nm para el DAPI. Todas las imágenes adquiridas fueron capturadas por una

cámara digital *Olympus DP70*.

3.2.4 Ensayos de viabilidad celular (MTT).

Células SH-SY5Y se cultivaron 48 horas antes de recibir el tratamiento con los distintos péptidos en placas de 96 multipocillos. Pasados los distintos tiempos de incubación, a un volumen de 100 µl de medio de cultivo se le añadieron 10 µl de solución de marcaje MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) preparada en PBS, y se mantuvo durante un tiempo de cuatro horas a 37°C y 5% CO₂, pasado este tiempo y formados los cristales de formazán, se añadieron 100 µl de solución de solubilización (10% SDS en 0,01M de HCl), y se incubó durante toda la noche. Los resultados de estos ensayos se obtuvieron, mediante la lectura de la placa multipocillo en un lector de ELISA *VersaMax* de *Molecular Devices* a una longitud de onda de 650nm.

3.2.5 Inmunodetección de proteínas.

Las células SH-SY5Y cultivadas y tratadas en placas de 35mm durante distintos tiempos fueron lavadas con PBS 1X frío y lisadas en 20mM de MOPS (pH 7,0), 150mM de NaCl, 1mM de EDTA, 1% de NP40, 1% de Deoxicolato sódico, 0,1% de SDS, 1mM Ortovanadato sódico, 50mM NaF, 10 µg/µl de Leupeptina, 2 µg/µl de Aprotinina, 1 µg/µl de Pepstatina A y 1mM de PMSF. Una vez obtenidos los extractos proteicos totales, se procedió a la cuantificación de los mismos, mediante el método del ácido bicinonínico (BCA) ⁽²³⁷⁾, empleando el protocolo y los reactivos de la casa comercial Pierce. Cuantificadas cada una de las muestras se procedió a su separación en geles de SDS-PAGE al 15%, 12% u 8% de acrilamida y posteriormente se transfirieron a membranas de Nitrocelulosa (Schleicher&Schuell Bioscience). Realizada la transferencia de las proteínas se llevó a cabo la inmunodetección de las mismas. Previamente, para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos a las membranas, éstas se bloquearon en TBS con 0,1% Tween-20 (T-TBS 0,1%) que contiene 5% de leche desnatada en polvo, en agitación constante, durante distintos tiempos y temperaturas en función del anticuerpo. PARP fue bloqueado a 4°C toda la noche, mientras que la Caspasa 3 hidrolizada, fue bloqueado a temperatura ambiente durante dos horas. Las incubaciones tanto de los anticuerpos primarios como de los anticuerpos secundarios se realizaron en la misma solución utilizada durante el bloqueo. Los anticuerpos se emplearon a distintas diluciones: 1:2000 para PARP y 1:1000 para la caspasa 3 hidrolizada. La caspasa 3 hidrolizada se incubó a 4°C durante toda la noche, mientras que PARP, se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después de cada una de las incubaciones se realizaron 3 lavados de 15 minutos en T-TBS 0,1% y en agitación lenta. Realizados los lavados se procedió a la incubación de las membranas con los anticuerpos secundarios durante una hora a temperatura ambiente. Tanto PARP como la Caspasa 3 hidrolizada se incubaron con anti-IgG de conejo conjugada con HRP y se empleó en ambos caso una dilución 1:3000. A continuación se realizaron los lavados en cada caso como se describió anteriormente y se procedió a la visualización de las proteínas mediante quimioluminiscencia, empleando el sistema de detección ECL de Amersham Biosciences.

3.2.6 Análisis de ARN.

3.2.6.1 Extracción de ARN.

Células SH-SY5Y se cultivaron 48 horas antes de recibir el tratamiento con los distintos péptidos tanto en placas de 35 mm como de 100 mm. Una vez pasaron los tiempos de incubación correspondientes, en todos los casos se recogieron las células respectivamente en 250 µl ó 1ml del reactivo comercial *TRIzol-Reagent* (Sigma-Aldrich) que supone una versión mejorada del método de aislamiento en un sólo paso desarrollado por Chomczynski y Sacchi ⁽⁴³⁾ y se conservaron a -80°C hasta la extracción del ARN. Previo a la extracción del ARN se descongelaron las muestras y se mantuvieron cinco minutos a temperatura ambiente, para asegurar la completa disociación de los complejos núcleoproteicos. A continuación se añadieron 50 ó 200 µl de cloroformo respectivamente, y se agitaron las muestras vigorosamente durante 15 segundos, para luego dejarlas reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. Tras la centrifugación el ARN quedó en la fase acuosa, ésta se transfirió a tubos limpios, y el ARN fue recuperado mediante la precipitación del mismo con 125 ó 500 µl de isopropanol respectivamente, para ello, se dejaron las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente y a continuación se centrifugaron a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C. Precipitado el ARN, éste se lavó en 250 µl ó 1 ml de etanol al 75% y a continuación se centrifugó a 12.000 g durante 5 minutos a 4°C. Finalmente el ARN total extraído se resuspendió respectivamente en 15 ó 20 µl de agua milli Q tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

El ARN total extraído fue purificado mediante el kit comercial *Rneasy Total Isolation Kit* (QIAGEN). Este método está basado en un sistema de columnas con membranas de silica-gel que presentan propiedades de unión selectivas, lo que permite por un lado el aislamiento de moléculas de ARN mayores de 200 nucleótidos y por otro lado el enriquecimiento de las muestras en ARN mensajero (ARNm), ya que tanto los ARN ribosómicos 5.8S y 5S, así como los ARN transferentes que constituyen entre el 15-20% del ARN total son selectivamente excluidos por presentar tamaños inferiores a 200 nucleótidos. Además de la purificación del ARN se realizó al mismo tiempo una limpieza del mismo con DNAasa, para ello se utilizó el *RNAase-Free DNase Set* (QIAGEN). El ARN total se unió a la columna donde tras varios lavados con una solución que tiene etanol fue eluido de la columna con 35 µl de agua desionizada tratada con dietilpirocarbonato.

Tras la purificación del ARN se procedió a su cuantificación en un espectrofotómetro *GeneQuant Pro* (Pharmacia) e igualmente se obtuvo el cociente entre la absorbancia a 260 nm y a 280 nm. En todo momento se tuvo en cuenta que dicho cociente presentara un valor comprendido en un intervalo de 1.7-2.0, asegurando así una calidad mínima del ARN total, libre de impurezas, proteínas contaminantes, etanol, fenol y otras sales que disminuyen la eficiencia de todas aquellas reacciones que se realizarían *a posteriori*, tanto para el proceso de hibridación de los *microarrays* de oligonucleótidos de alta densidad, como para la RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR).

Finalmente, se comprobó la integridad del ARN total en un gel de agarosa al 1%, comprobando la relación de intensidad entre los ARN ribosomales 28S Y 18S, así como la clara ausencia de un *smear*, lo que indicaría una degradación parcial o total del ARN.

3.2.6.2 Análisis de la expresión génica con la plataforma *Genechip*® de Affymetrix.

Genechips de Affymetrix.

Para llevar a cabo el análisis global de la expresión génica utilizamos los *microarrays* de expresión de alta densidad *Genechip*® de Affymetrix que son ampliamente ventajosos respecto a otras plataformas. Entre todos los disponibles se seleccionó el *chip* HG-U133 Plus 2.0. Este *chip* permite el análisis de los niveles de

expresión de 47.000 transcritos y variantes, incluyendo 38.500 genes humanos perfectamente caracterizados. Éstos se encuentran representados por más de 54.000 sondas y 1.300.000 oligonucleótidos distintos, lo que permite realizar múltiples medidas independientes para cada uno de los transcritos, aportando exactitud y reproducibilidad a los datos resultantes. La estrategia particular de estos *chips* consiste en la síntesis de varias parejas de oligonucleótidos (de 11 a 20 parejas en función del *chip*) para cada gen, seleccionados en una región próxima al extremo 3' de la secuencia del ARNm. Cada pareja de sondas o "*probepair*" consiste en una secuencia complementaria al ARNm (sonda "*perfect match*") y otra secuencia que difiere respecto a la primera en un único oligonucleótido central (sonda "*perfect mismatch*") (Figura 5). El desarrollo de esta estrategia permite por un lado la cuantificación y la substracción de la señal causada por las hibridaciones inespecíficas características de este tipo de *chips*, mientras que por otro lado permite llevar a cabo la discriminación entre miembros de una misma familia de genes y por último permite la identificación de transcritos raros o cuya expresión es discreta. Estas características son muy ventajosas respecto a las que presentan otros *chips* ya que confieren especificidad y sensibilidad a los experimentos, facilitando así la obtención de resultados robustos.

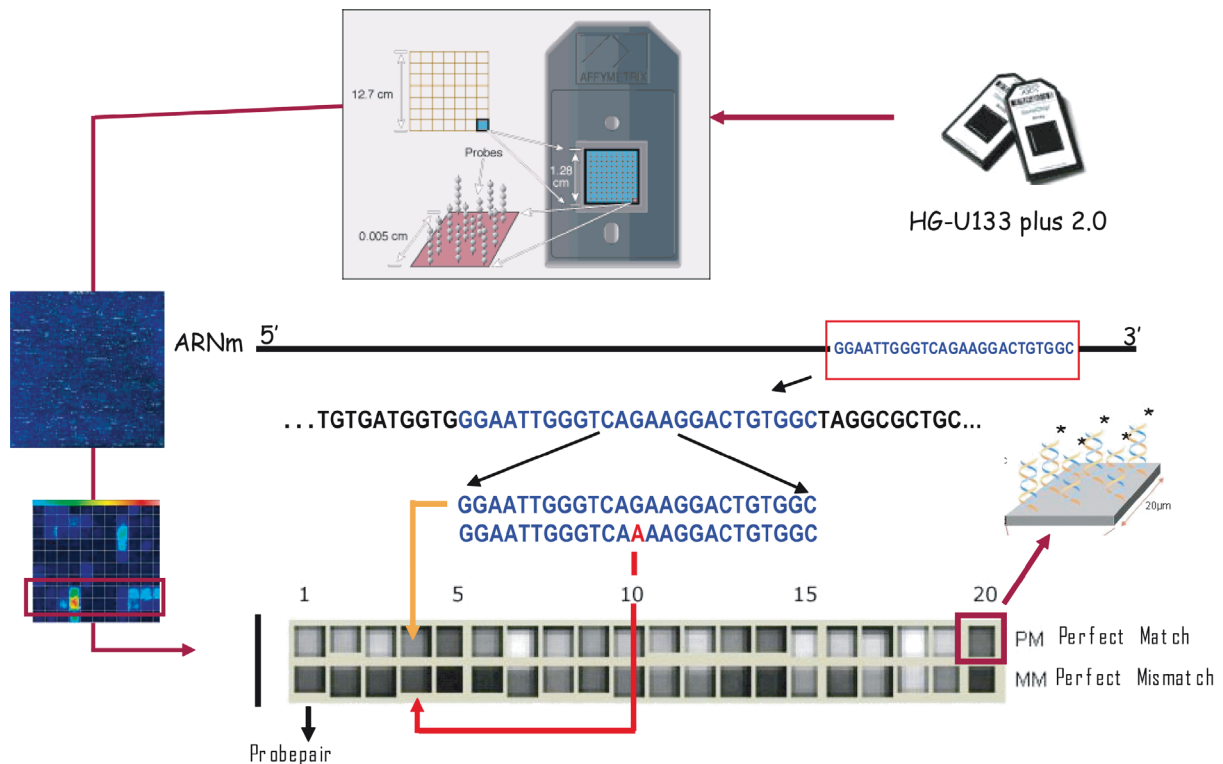


Figura 5. Tecnología GeneChip® de Affymetrix. Cada *chip* está constituido por una superficie de vidrio con un tamaño de 1,27x 1,27 cm sobre la que se sintetizan todos y cada uno de los conjuntos de sondas. Cada conjunto está a su vez constituido por parejas de sondas (*Perfect Match* y *Perfect Mismatch*), que presentan un tamaño de 25pb y son iguales entre sí exceptuando un nucleótido en la posición central (señalado en rojo en la figura) que ha sido sustituido por el complementario en la sonda *Perfect Mismatch*. Gracias a este tipo de oligonucleótidos es posible calcular tanto el ruido de fondo como la hibridación inespecífica. Lo que es muy importante para la detección de ARNm que se expresan en bajos niveles. Cada una de las celdas con un tamaño de 20µm presenta 4x10⁸ copias de cada sonda específica marcada con fluorescencia.

Todas las sondas recogidas en este *chip* fueron diseñadas a partir de secuencias obtenidas directamente de bases de datos como *GenBank*, *db EST* y *RefSeq*, *Washington University of California*, *Santa Cruz Goleen-Path human genome database* y la *NCBI human genome assembly*.

Cada conjunto de sondas en el *chip* HG-U133 Plus 2.0, está formado por once parejas de sondas, que permiten medir los niveles de transcripción de cada una de las secuencias representadas en el *microarray* y poseen un código numérico seguido de distintos sufijos.

_at	Designa un conjunto de sondas que hibrida con una única secuencia correspondiente con un único transcrito.
_a_at	Designa un conjunto de sondas que hibrida con secuencias correspondientes a la misma familia génica.
_s_at	Designa un conjunto de sondas en el que todas ellas son compartidas por dos o más secuencias. Pueden representar formas más cortas de transcritos con más de un sitio poliadenilación, región común en los extremos 3' de formas de procesamiento alternativo de un transcrito o transcritos que presentan un alto grado de homología.
_x_at	Designa a un conjunto de sondas que comparten algunas sondas para dos o más secuencias

Síntesis y marcaje de ARN copia (ARNc).

A partir de 5 µg de ARN total purificado y limpio de ADN con DNasa, se sintetizó el ADN complementario (ADNc) de cada una de las muestras, con el *GeneChip Expression 3'-Amplification Reagents One-Cycle cDNA Synthesis kit*, siguiendo el protocolo del manual técnico recomendado por *Affymetrix*. Este ADNc se utilizó como molde para sintetizar el ARNc marcado con biotina siguiendo el protocolo del *GeneChip Expression 3'-Amplification Reagents for IVT labeling kit de Affymetrix*. El ARNc se purificó con el *GeneChip Sample Cleanup module Kit* de *Affymetrix*, recuperándose en un volumen de 22 µl de agua milliQ. Para la posterior hibridación de los *chips* son necesarios 15 µg de ARNc, es por lo que éste se cuantificó espectrofotométricamente. Igualmente se comprobó la integridad del ARNc mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, donde tras la iluminación con luz ultravioleta debe observarse un rastro de bandas con un tamaño igual o superior a 2Kb. Sintetizado y purificado el ARNc se tomaron 15 µg del mismo para cada una de las muestras y se fragmentó mediante una hidrólisis química a 94°C durante 35 minutos, con el *buffer* de fragmentación 5X incluido en el *GeneChip Sample Cleanup module kit* de *Affymetrix*. Realizada la fragmentación se comprobó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que el tamaño del ARNc fragmentado comprendía tamaños entre 35-200 nucleótidos, ya que esto es fundamental para una correcta hibridación de las mezclas con los *chips*.

Hibridación y escaneado de los microarrays HG-U133 Plus 2.0. Análisis de los controles de calidad.

Se utilizaron 15 µg de ARNc marcado y fragmentado para preparar las mezclas de hibridación (300 µl), en las que se incluyen también los distintos controles. En todos los casos la hibridación de los *chips* se llevó a cabo en un horno de hibridación durante la noche a 45°C. A continuación en una estación fluidica automatizada los *chips* fueron lavados, con dos tipos de *buffer*, inicialmente con uno poco astringente y luego con más astringente. Realizados los lavados, los *chips* se incubaron inicialmente con un conjugado de estreptavidina-ficoeritrina (SAPE), a continuación con un anticuerpo de cabra anti-estreptavidina biotinilado, con el fin de amplificar la señal, y por último fueron incubados con el conjugado de estreptavidina-ficoeritrina de nuevo, permitiendo así obtener una señal capaz de ser detectada por el láser. Una vez que los *chips* fueron teñidos, estos fueron lavados y posteriormente escaneados en el *Gene Chip Scanner 3000*.

La inspección visual de los *arrays* proporciona una idea general de la calidad del experimento. Se considera como válida una imagen con fondos oscuros y brillantes y con unos niveles de ruido de fondo homogéneo con valores comprendidos entre 20 y 100; mientras que muestras problemáticas, mal hibridadas o que han sido incorrectamente adquiridas por el escáner, pueden presentar elevadas señales de fondo que ocultarían la señal real. En los experimentos descritos en el apartado de resultados la imagen resultante era con fondos oscuros y brillantes y con un nivel de ruido de fondo comprendido en el intervalo aceptable (en torno a 60 para todos los *arrays*), lo que indica una buena hibridación de los *chips a priori*. Una vez observadas las imágenes de cada *chip* se comprobaron dos parámetros fundamentales para valorar la calidad de las muestras de hibridación. El primero de estos parámetros es la presencia de los controles internos de sensibilidad. Estos controles son el *BioB*, el *BioC*, el *BioD* y *Cre* y todos ellos se corresponden con genes de la ruta de biosíntesis de biotina de *E. coli*, y su presencia indica que tanto los procesos de hibridación, lavado, revelado y escaneado se han realizado satisfactoriamente. El *BioB* es el control menos representado en la mezcla de hibridación, de forma que su presencia es la que se utiliza principalmente para valorar la sensibilidad del experimento. El segundo de los parámetros de control a tener en cuenta son las sondas correspondientes a los genes *housekeeping*. Estas sondas se corresponden con genes expresados de forma constitutiva en todo tipo de tejidos, tales como el *GAPDH* (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y la β -*actina*. En el *microarray* existen sondas que se corresponden a las zonas 3', central y 5' de estos genes. Las señales de hibridación para las sondas 3' respecto a la de las 5' proporciona información acerca de la integridad de los ARNc sintetizados, siendo ésta un reflejo directo de la calidad del ARN original utilizado para su síntesis. Así una relación 3'/5' entre las señales de hibridación cercana a 1 indica una integridad del ARN inicial y del ARNc sintetizado, así como una correcta transcripción del ADNc y del ARNc biotinilado. Este valor puede variar en función de la procedencia de la muestra y del tratamiento aplicado y en ocasiones resulta complejo obtener un ARNc totalmente íntegro, es por ello que el criterio recomendado por *Affymetrix* para considerar un experimento como satisfactorio es que la relación 3'/5' no debe superar el valor de 3 en ningún caso. Las muestras empleadas para el análisis de la expresión génica en este experimento cumplían perfectamente los controles de calidad, de forma que el *spike control BioB* estaba presente en todos los *microarrays* y la relación 3'/5' de todos los *chips* presentaba un valor medio de 1,1, lo que indica que todos ellos superaban los controles de calidad establecidos y recomendados por *Affymetrix*.

Procesado y análisis de datos: escalado/normalización de los datos.

Para llevar a cabo el procesado y análisis de datos, se empleó el *software* GCOS 1.1, que procesa la imagen obtenida durante el escaneado y calcula la intensidad de cada sonda en el *array*. Como paso previo a la comparación de los *arrays* se llevó a cabo el escalado y normalización de los datos para cada uno de ellos. El escalado es un método global en el que se considera que la intensidad media de todas las sondas entre los distintos *chips* debe ser similar pues las muestras no presentan, de forma global, grandes cambios de expresión y se espera que tan sólo cambien un pequeño número de transcritos. Este método permite corregir pequeñas discrepancias en la intensidad debidas a variables experimentales tales como la preparación de la muestra, los errores de pipeteo, diferencias en las condiciones de hibridación, lavado o en la eficiencia de la tinción o el marcaje. Usando el *software* GCOS 1.1, todos los *arrays* se escalaron definiendo como la intensidad media el valor arbitrario 50. GCOS 1.1 calcula la intensidad media de todo el *array* promediando los valores de intensidad de todos los conjuntos de sondas a excepción del 2% de los valores con mayor y menor intensidad. Esta intensidad media es multiplicada finalmente por el valor arbitrario seleccionado, obteniendo así el factor de escalado. Los factores de escalado de cada uno de los *arrays* deben ser próximos entre ellos en un mismo experimento, de forma que el factor de escalado de uno de los *arrays* no sea superior en 3 veces a cualquiera de los otros y lo

más cercano posible a 1. La existencia de un factor de escalado superior en tres o más veces a cualquiera de los demás indicaría una gran variabilidad biológica en el ensayo o bien la degradación de los transcritos utilizados para el proceso de normalización. Los factores de escalado aplicados a cada una de las muestras del experimento estaban dentro de los límites establecidos por *Affymetrix* (con un valor medio de 1,1) asegurando la posibilidad de realizar comparaciones entre los distintos *arrays* y aportando fiabilidad a los resultados. Una vez las señales de intensidad fueron normalizadas en todos los *arrays*, empleando el GCOS 1.1 se calcularon por un lado el valor de señal, que se corresponde con la abundancia relativa de un transcrito para cada grupo de sondas, y por otro lado un valor de probabilidad asociado que determina el nivel de significación estadística para la presencia o ausencia de un determinado ARN mensajero en el experimento. Este valor de probabilidad fue calculado a partir del test no paramétrico de *Wilcoxon* ⁽²⁷⁷⁾. Calculados los valores de señal para cada uno de los transcritos, se observó el porcentaje de genes presentes en cada uno de los *arrays* con el fin de determinar de nuevo si los *chips* eran o no comparables, de forma que debían estar presentes al menos un 25% de los mismos y no presentar diferencias superiores al 10% para poder aceptar el experimento como correcto; la existencia de un porcentaje inferior indicaría que se perdió representación de los genes menos expresados en baja proporción por tanto la información del experimento sería incompleta. En este experimento el valor medio de genes presentes en todos los *arrays* era de un 36%, superior al mínimo recomendado para muestras de origen humano. Por otro lado se calculó el SLR (*SignalLogRatio*), a partir del cual se determinó cuál era la tasa de cambio de las muestras tratadas con PrP106-126 y A β 25-35 respecto a los controles. El SLR fue calculado para todas las comparaciones empleando el algoritmo matemático de *Tukey's Biweight*, ⁽²⁶⁰⁾ igualmente se obtuvo un valor de probabilidad asociado al SLR, empleando la distribución de la *t*, que determinó el nivel de significancia estadística de todas las tasas de cambio calculadas.

Análisis e integración funcional de los perfiles de expresión génica.

Para poder llevar a cabo un análisis global y detallado de los perfiles de expresión génica asociados a la toxicidad inducida tanto por el PrP106-126 como por el A β 25-35, así como la integración de los mismos en procesos funcionales y moleculares, se emplearon distintas herramientas bioinformáticas que permitieran la obtención de la máxima información posible.

Entre las técnicas utilizadas para el estudio de modelos de expresión, se encuentra la del *Clustering* jerárquico ⁽⁵⁹⁾ El *clustering* jerárquico es un método estadístico ampliamente utilizado que permite una representación de los datos en forma de árbol binario, en el cual los patrones de expresión más parecidos entre sí se agrupan siguiendo una jerarquía. Para llevar a cabo esta organización cada gen se considera como un vector con "*N*" dimensiones donde "*N*" es el número de experimentos. Cada uno de los genes se representa como un punto en un espacio *N*-dimensional, entonces se calcula la distancia entre todos los genes, obteniendo una distancia matriz, que proporciona un sentido a aquellos grupos de genes que se encuentran más próximos entre sí en el espacio *N*-dimensional; esta distancia es una medida cuantitativa de la proximidad o diferencia entre los genes considerados, lo que permite definir la relación que buscamos entre los genes. Para la obtención de la distancia matriz existen distintas distancias métricas aplicables que serán utilizadas en función del tipo de experimento diseñado.

Una vez han sido calculadas las distancias métricas individuales entre todos los genes, se procede al agrupamiento de los mismos en un sistema jerárquico, para ello se calculan los cocientes de separación que definirán el árbol formado por grupos discretos y ramificaciones, empleando tres posibles métodos: el método del ligamiento promedio (*average-linkage*), el del ligamiento simple (*simple-linkage*) o el del ligamiento completo (*complete-linkage*), la selección de uno u otro método se realiza de nuevo en función del diseño experimental.

Esta organización jerárquica en pequeños agrupamientos podría ser un indicativo de la existencia de genes con comportamientos similares a nivel de la expresión (co-expresados), de forma que genes que se comportan de la misma forma, podrían compartir la misma función molecular o biológica. Esto podría aportar gran cantidad de información a cerca de posibles relaciones no contempladas hasta entonces para los procesos sometidos a estudio.

Para llevar a cabo el análisis de clustering jerárquico, se emplearon dos herramientas bioinformáticas diferentes: TIGR MultiExperiment Viewer ⁽²¹⁸⁾ (<http://www.tm4.org/>) y Genesis ⁽²⁴⁷⁾ (http://genome.tugraz.at/genesisclient/genesisclient_description.shtml).

A partir de los agrupamientos obtenidos del clustering jerárquico se integraron los datos de expresión génica con ciertas rutas y funciones biológicas conocidas, para ello se utilizaron distintas herramientas bioinformáticas de ontología génica como Onto ExpressTM y Pathway ExpressTM ^(126, 127) (<http://vortex.cs.wayne.edu/projects.htm>), el software yEd (http://www.yworks.com/en/products_yed_about.html), así como la herramienta FatiGO implementada en la interfaz BABELOMICS ^(4, 5) (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es>).

Pathway Express es un software que realiza un proceso analítico de enriquecimiento clásico basado en una distribución geométrica y una corrección para test múltiples, *False Discovery Rate* (FDR), con el fin de identificar aquellas rutas que presentan una proporción de genes diferencialmente expresados y significativamente distinta de aquella que se esperaría como consecuencia del azar. Los genes agrupados en los distintos grupos experimentales se asignaron a distintas categorías biológicas, moleculares o de rutas biológica en función del número de genes recogido para categoría ontológica en el total de genes representados en el array así como en las rutas y procesos determinados y recogidos por las diferentes bases de datos públicas: KEGG, Biocarta, NCI-Nature y INOH. La significancia estadística de cada proceso enriquecido se estableció mediante el empleo del p-valor para test múltiples (FDR). Así aceptamos como procesos biológicos significativos aquellos con un $FDR < 0.05$. Todos los procesos biológicos, moleculares y rutas biológicas se organizaron en función de este valor FDR determinando así su significancia. Para las rutas Biológicas además de tener el valor FDR contamos también con el factor de impacto (IF), que nos aporta información acerca de la importancia y peso específico de un cambio dentro de una ruta en función del gen que se ha visto alterado. El factor de impacto en una determinada ruta se calcula empleando un término probabilístico que tiene en cuenta la proporción de genes diferencialmente expresados en la ruta así como todos los factores de perturbación que se generan en la ruta como consecuencia de la afectación de uno u otro gen en el total de genes presentes en la ruta. Para ello se incorporan parámetros de cómo la tasa de cambio normalizada de los genes diferencialmente expresados, la significancia estadística del conjunto de genes recogidos en cada ruta y la topología de cada ruta. El IF contribuye por tanto a la obtención de resultados con significancia biológica, lo que permite contextualizar los datos obtenidos en información biológica. Las rutas más significativas fueron seleccionadas en base a dos conceptos diferentes: la significancia estadística de una determinada ruta, desde la perspectiva de los genes contenidos en ella y la significancia del factor de impacto. En ambos casos se aceptaban como significativos aquellos procesos con $FDR < 0.05$. Finalmente aquellas rutas obtenidas con una significancia estadística y biológica se introdujeron en YEd, un programa de edición de gráficos GML, que permite observar cómo los factores de perturbación inducidos por cada uno de los genes alterados en la ruta se propagan y afectan al resto de los genes que componen la lista. En los gráficos generados los genes significativos están representados con nodos elípticos y con colores que oscilan del azul-verde-amarillo-naranja-rojo en función del grado de sobreexpresión o represión que presentan, siendo los rojos aquellos que presentan

las tasas de cambio más sobreexpresadas y los azules aquellos más reprimidos. Igualmente la dirección de la perturbación originada por cada gen significativo en la ruta y los genes afectados por la misma están representados por flechas y nodos rectangulares, respectivamente, del mismo color que el gen que las genera.

3.2.7. RT-PCR en tiempo real.

Tratamiento con DNasa I.

Antes de llevar a cabo la síntesis de ADNc a partir del ARN total, todas las muestras se trataron con DNasa I con el fin de eliminar posibles restos de ADN genómico, que podrían dar lugar a la obtención de resultados poco precisos. Para la limpieza con DNasa I se utilizó la *DNAase I amplification grade* de invitrogen. 2 µg de ARN total de cada una de las muestras fue tratado con 1U de DNasa I, durante 15 minutos a temperatura ambiente, a continuación la enzima fue inactivada mediante la adición de EDTA 25 mM a la mezcla de reacción seguido de una inactivación térmica a 65°C durante 10 minutos.

RT-PCR: transcripción inversa y síntesis de ADN copia (ADNc).

Tomando 1µg de ARN total limpio de ADN se realizó la transcripción inversa para la obtención del ADNc, y se empleó para ello la *Superscript II Reverse transcriptase*. Para llevar a cabo la retrotranscripción, el ARN se incubó inicialmente junto con una mezcla de 500 ng Oligo (dT)₁₂₋₁₈, 10mM de dNTPs durante 5 minutos a 65°C e, inmediatamente después se enfrió en hielo. A continuación se preparó una mezcla formada por 5X *First-Strand buffer*, 0,1 M DTT y 40 U de RNAsin, para inhibir la actividad de las RNAsas. Esta mezcla se incubó durante 2 minutos a 42°C con el ARN, y a continuación se le añadieron 200 U de *Superscript II*. La reacción de transcripción inversa se realizó durante 50 minutos a 42°C, y finalmente se inhibió mediante inactivación térmica a 70°C durante 15 minutos. A los 20 µl finales de la reacción se le añadieron otros 20 µl de H₂O desionizada-DEPC.

Diseño de cebadores para PCR en tiempo real.

Para realizar la amplificación por PCR se diseñaron oligonucleótidos tanto directos como reversos, específicos para cada secuencia. En el momento de su diseño se tuvieron en cuenta distintos parámetros como su longitud (en torno a 20 pb), el porcentaje de GCs, la posibilidad de formación de dímeros de cebadores, así como la formación de estructuras secundarias. Igualmente se contempló que el par de cebadores fuera diseñado frente a dos exones distintos (para evitar así la amplificación de ADN genómico), lo más próximo a la cola de poli-A, y que el tamaño del amplicón fuera lo más próximo a 100 pb y no mayor de 300 pb. Algunos de los pares de oligonucleótidos se obtuvieron de distintas bases de datos donde se recogen cebadores que ya han sido previamente testados, en estos casos se comprobó que por un lado cumplieran las características adecuadas anteriormente expuestas y por otro que amplificaran la secuencia para la que estaban diseñados.

Entre las bases de datos utilizadas se encuentran:

- *Quantitative Primer Database (QPPD)* (<http://web.ncicrf.gov/rtp/gel/primerdb/>)
- *PrimerBank* (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>).^(245, 271)
- *RTprimerDB* (<http://medgen.ugent.be/rtpprimerdb/>).^(143, 196)
- *Real time PCR primersets* (<http://www.realtimeprimers.org/>).

Para aquellos genes que carecían de par de cebadores diseñado en estas bases de datos, se les diseñó su par de oligonucleótidos correspondiente empleando la interfaz *Primer3*⁽²¹⁶⁾ (<http://primer3.sourceforge.net>). En la Tabla 1 se muestran las secuencias de todos los cebadores que fueron sintetizados por Invitrogen.

Una vez diseñados todos los pares de cebadores se realizaron diversas PCRs con las mismas condiciones de amplificación que las que serían utilizadas durante la PCR en tiempo real. Estas PCRs se realizaron con dos fines; el primero de ellos era comprobar que el tamaño del amplicón para cada par de cebadores era el adecuado y el segundo era tratar de encontrar una relación de cebadores directo (D)/reverso (R) que permitiera por un lado la máxima eficiencia en la amplificación durante la PCR y por otro lado evitar la formación de dímeros de oligonucleótidos, ya que estos últimos podrían enmascarar los resultados durante la cuantificación. Así fueron cuatro las relaciones que se testaron para cada par de cebadores: 150ng D/ 150ng R, 150ng D/ 400ng R, 400ng D/ 150ng R y 400ng D/400ng R (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencias de los cebadores utilizados para la realización de las PCR en tiempo real.

Gen	Probeset ID †	Cebador Directo	Cebador Reverso	Ratio D/R §	Fuente ±
Crop	1555889_a_at	5' GACTTCCTCTTGGCGTTACAG 3'	5' GAGGTGGCAGGTGTGAAGAT 3'	150ng/400ng	Primer3
RAB2	208730_x_at	5' GCGACACAGGTGTGGTAAAT 3'	5' TCATTCGAGCACCGAACTCTA 3'	400ng/150ng	Primerbank
TGFb1 induced transcript 111	209651_at	5' TGTGAGCTAGATCGGTGCTT 3'	5' GGGAGGCTGGGTCTTTCTTAT 3'	150ng/400ng	Primerbank
3-Hydroxy 3 methylglutarylcoenzyme A reductase	202540_s_at	5' GGCTGGGGAATTGTCACTTA 3'	5' TAGAACCCCAATGCCCATGTT 3'	150ng/400ng	Primer3
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein a2/b1	225107_at	5' GGCTACGGAGGTGGTTATGA 3'	5' ACCATAACCCCACTTCCTC 3'	150ng/400ng	Primer3
TRAF family member associated NFkappaB	209451_at	5' GACCCATCTGATGCACCTTT 3'	5'AATGGATGGTGGGAAACTG 3'	400ng/400ng	Primer3
Scavenger receptor class B, member 2	201646_at	5' GCTGGAGTACAGTGGCATGA 3'	5' GTGAACCCCGTCTCCACTA 3'	400ng/400ng	Primer3
Egr-1	201694_s_at	5' TAAGGAAGAGGGCTGAGCTG 3'	5' TACAAAATCGCCGCTACT 3'	400ng/400ng	Primer3
Fos	209189_at	5' GATGTAGCAAAACGCATGGA 3'	5' TCCAGCACCAAGTTAATTC 3'	400ng/400ng	Primer3
LIM domain only 3	204424_s_at	5' CCCCTTTGTTGTGTAGCC 3'	5' TCAGCACTCTGTTGAGTGG 3'	400ng/150ng	Primer3
TNF receptor superfamily, member 5.	35150_at	5' CACACTGCCACCAACAAA 3'	5' GCCTTCTTCACAGTGCAGAT 3'	150ng/150ng	RtprimerDB
Wnt6	71933_at	5' AGAGTGCCAGTTCCAGTCC 3'	5' ATGAACAGGCGCTGCGTAC 3'	400ng/150ng	Primer3
Dickkopf homolog 1	204602_at	5' ATAGCACCTTGGATGGGTATCC 3'	5' CACAGTCTGATGACCGAGA 3'	150ng/150ng	Primerbank
Thioredoxin interacting protein	201008_s_at	5' CTGGCGTAAGCTTTCAAGG 3'	5' GTGCACAAAGGGGAAACACT 3'	400ng/400ng	Primer3
Hypothetical protein MGC3032	218641_at	5' AAGCCAGCTTAAGGGTCACA 3'	5' ACGCAAAAGCAGCGCTGTAAT 3'	400ng/400ng	Primer3
Tropomyosin 4	209344_at	5' TGGGTCAACTGTTGGTCAAA 3'	5' GAAGGGCCAGGATCTTAGG 3'	150ng/150ng	Primer3
Activin A	210511_s_at	5' ATTGCTCCCTCTGGCTATCA 3'	5' ATTGCTCCCTCTGGCTATCA 3'	400ng/400ng	Primer3
Chemokine C-C motif ligand 2	216598_s_at	5' CAGCCAGATGCAATCAATGCC 3'	5' TGAATCCTGAACCCACTTCT 3'	400ng/400ng	Primerbank
Malat1	1558678_s_at	5' AACCCCAACAGGAAATAGG 3'	5' TGAAGCAGGACAACCACTG 3'	400ng/400ng	Primer3
NADH dehydrogenase 5	211600_at	5' CCCTCACCTTAACAGGTCAA 3'	5'GCGAGGGCTGTGAGTTTATG 3'	150ng/150ng	Primer3
NADH dehydrogenase 6	1553575_at	5' CCATCGCTAACCCCACTAAA 3'	5' TGATTGTTAGCGGTGTGGTC 3'	150ng/150ng	Primer3
Crap1	203804_s_at	5' AGTCGGGATCGAAGAAGATCA 3'	5' ACTACCGGACTTCACACTACTT 3'	150ng/150ng	Primerbank
C6ORF111	212176_at	5' AGCAATAGGGCTAGGGTAAAGA 3'	5' TACGTCTCTCTCGGGAAGGAC 3'	400ng/150ng	Primerbank
Topoisomerase DNA II alpha	201291_s_at	5' TCCTGCCAAACCAAGAATC 3'	5' GTACAGATTTTGCCTGAGGA 3'	150ng/150ng	Primer3
KIAA1181	224576_at	5' TGAATGATAGGCCACAAACCA 3'	5' CTCCCAAGTGCTGGGATTA 3'	400ng/400ng	Primer3
NDP014	209006_s_at	5' TCAGCTAAAGCTGCCACAGA 3'	5'GTACCCCTGAATGGCTCAAA 3'	400ng/400ng	Primer3
Kinesin family member 1A	1559151_at	5' AGTTAGTCCGTCCCTGGTT 3'	5' TCAAGTGACACGACAGTACA 3'	150ng/150ng	Primer3
Gapdh	---	5' CGACCACCTTTGTCAAGCTCA 3'	5' AGGGGAGATTGAGTGTGGTG 3'	400ng/400ng	Primer3
L19	---	5'GCGGAAGGGTACAGCCAAT3'	5' GCAGCCGGCGCAAA 3'	150ng/150ng	Primer3

† Identificación asignada por Affymetrix para cada par de sondas

§ Relación de cebador directo/reverso utilizada para cada PCR.

± Fuente a partir de la cual fueron obtenidos

PCR en tiempo real y análisis de la expresión.

Una vez fue sintetizado el ADNc se realizó la PCR en tiempo real en el *MX3000 detection system*, partiendo de 2 µl del ADNc (50ng) y utilizando para ello el *kit Brilliant SYBR Green QPCR master mix* de Stratagene. El protocolo de PCR utilizado fueron 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C para desnaturalizar el ADNc y activar a la ADN polimerasa, un programa de amplificación de 40 ciclos: 15 segundos a 95°C (desnaturalización), 30 segundos a 60°C (anillamiento de los cebadores y primer punto de adquisición de la fluorescencia), 30 segundos a 72°C (extensión y segundo punto de adquisición de la fluorescencia) y finalmente se añadieron 3 minutos a 72°C para asegurar la extensión final del producto. En todas las PCRs se realizó además una curva de disociación que consistió en un ciclo de 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 55°C y finalmente 30 segundos a 95°. Esta curva nos permitió observar si se daba la amplificación exclusiva de un único producto, o si por el contrario existía la amplificación de productos inespecíficos o bien la formación de dímeros de oligonucleótidos.

La cuantificación se realizó por tanto utilizando el *SYBR Green*, una molécula que se une específicamente a ADN de doble cadena y que en esas condiciones emite fluorescencia cuando éste se excita a una determinada longitud de onda ⁽²²⁷⁾. El *MX3000 detection system* mide la fluorescencia emitida después de cada ciclo de amplificación, con lo cual la cuantificación se realiza en tiempo real, permitiendo así estimar la cantidad relativa de la secuencia en las distintas muestras durante la fase logarítmica de la reacción ⁽¹⁰⁰⁾. El valor de fluorescencia que se obtiene tras la realización de las reacciones para cada muestra es el Ct o *crossing threshold*, que se

corresponde con el número de ciclos para el cual cada muestra alcanza una fluorescencia determinada en la fase logarítmica de la reacción, en la cual su valor es superior al ruido de fondo.

Las diferencias en la amplificación génica se cuantificaron de forma relativa mediante el método $2^{\Delta\Delta Ct}$ ⁽¹⁵²⁾, el cual permite calcular los cambios de expresión relativos de cada muestra o tratamiento respecto a una referencia (controles no tratados), y normalizando al mismo tiempo los niveles de ADNc utilizados en la reacción de PCR respecto a un control endógeno o *housekeeping* (*L19* o *GAPDH*), cuyo nivel de expresión sea constitutivo, es decir que no varíe en esa línea celular por efecto del tratamiento en las distintas muestras. Para determinar si las diferencias observadas durante la amplificación eran significativas, se compararon los niveles de expresión relativos entre los controles y los tratamientos mediante un test de la “*t*” de *student* de dos colas para muestras pareadas, empleando para ello el *software* estadístico SPSS.

4. RESULTADOS.

4.1. Los péptidos neurotóxicos A β 25-35 y PrP106-126 producen una reducción de la viabilidad celular e inducen la apoptosis en células SH-SY5Y.

Aunque el principal objetivo de este estudio consiste en la identificación de genes regulados transcripcionalmente durante las primeras etapas de la neurotoxicidad inducida tanto por el A β 25-35 como por el PrP106-126, es fundamental demostrar cómo una exposición prolongada de las células a estos péptidos induce la muerte de las mismas por apoptosis y en consecuencia una disminución de las células viables. Sólo de esta forma podremos asegurar que aquellos genes regulados en fases tempranas de la toxicidad inducida por ambos péptidos se expresan en un contexto celular que implica muerte celular programada.

4.1.1. El A β 25-35 y el PrP106-126 producen una reducción de la viabilidad celular en células SH-SY5Y.

Previo a los ensayos realizados para demostrar el efecto neurotóxico de cada uno de los péptidos con los que se iba a trabajar, se optimizaron las condiciones experimentales en el modelo celular SH-SY5Y y se eligieron aquellas que permitían un control exhaustivo del mayor número de variables, proporcionando un modelo controlado que permitiera la obtención de resultados robustos y reproducibles. Para ello se testaron dos suplementos N2 y B27, que se emplearían en sustitución del suero bovino fetal (FBS). Mediante ensayos MTT, se evaluó la viabilidad de las células en las condiciones basales de cultivo y a distintos tiempos (24, 48 y 72 horas). Como puede observarse en la figura 6A, los niveles de viabilidad para los dos suplementos son comparables a los obtenidos cuando las células se mantienen en FBS e incluso mejores a las 72 horas. Esto nos asegura que partimos de las condiciones de cultivo óptimas para llevar a cabo los experimentos de neurotoxicidad. De entre los dos suplementos elegimos el N2 como sustituto del suero, de forma que todos los experimentos se realizaron en presencia del mismo.

Para poder valorar la toxicidad inducida tanto por el A β 25-35 como por el PrP106-126, y tratar de determinar si ésta promueve una reducción de la viabilidad celular, células SH-SY5Y fueron sometidas a tratamientos de 16 y 24 horas con camptotecina 1 μ M, sustancia inhibidora de la topoisomerasa II, utilizada como control positivo, que precipita a la célula a una muerte irreversible por apoptosis, con PrP106-126 preparado tanto a pH 5,5 (donde se favorecen las formas fibrillogénicas) como a pH 7 (donde se favorecen las formas solubles) y con A β 25-35, a dosis 10 y 50 μ M para ambos péptidos. Como puede observarse en la figura 6B, a las 16 horas ya existe un descenso altamente significativo en la viabilidad celular ($p < 0,001$) respecto a los controles, no sólo en las células tratadas con camptotecina 1 μ M, sino en aquellas tratadas tanto con A β 25-35, como con PrP106-126 preparado tanto a pH 5,5 como a pH 7. El descenso en la viabilidad es acusado en ambos tratamientos tanto a dosis 10 μ M (70% y 40-50% respectivamente) como a 50 μ M (70%). De la misma forma, a las 24 horas (Figura 6C) se observa un descenso de gran magnitud en la viabilidad, similar a la obtenida a las 16 horas o incluso un poco mayor para todos los tratamientos. En efecto, podemos concluir que como consecuencia de la toxicidad inducida tanto por el A β 25-35 como por el PrP106-126, se reducen los niveles de viabilidad celular de forma considerable.

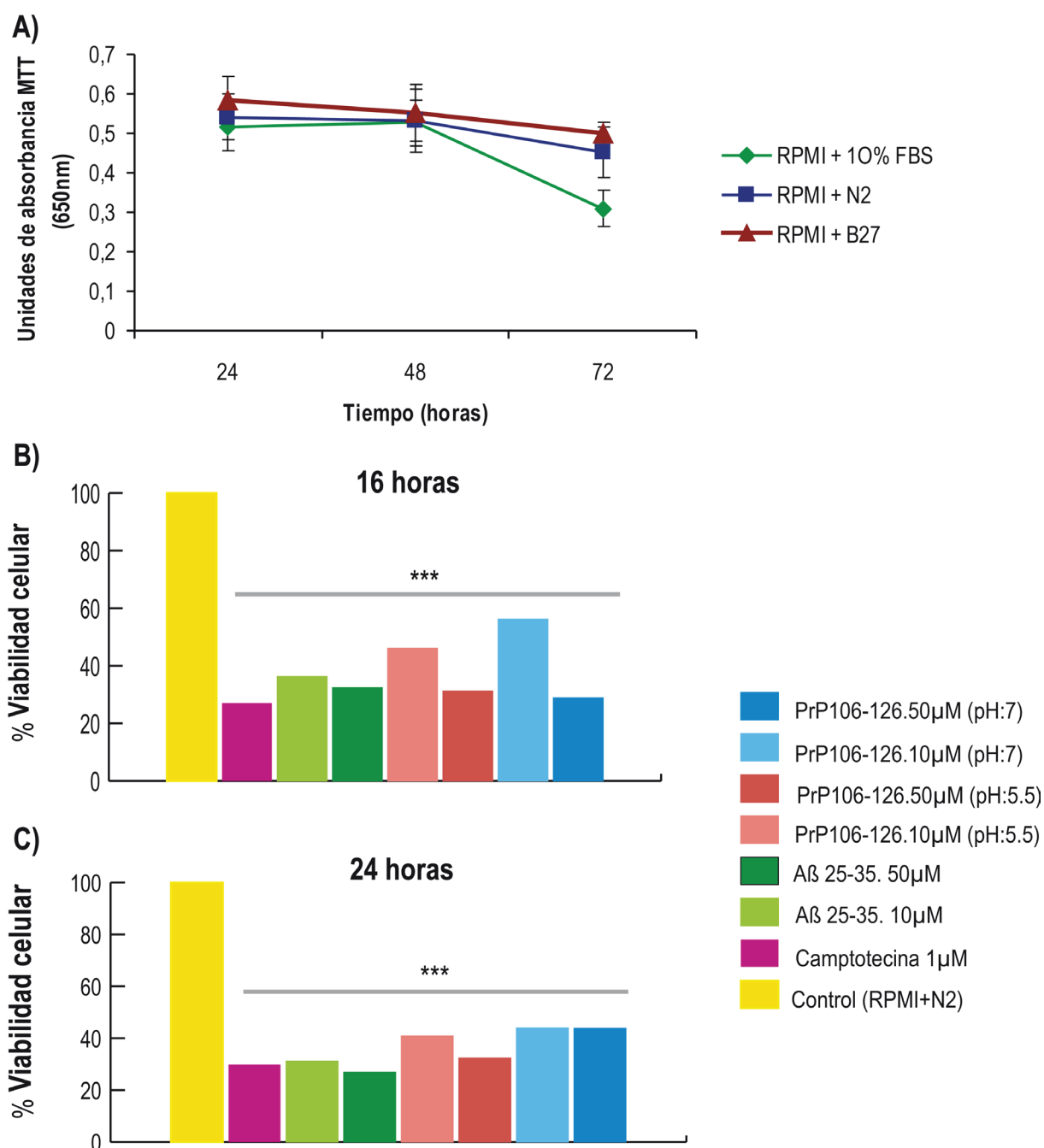


Figura 6. Aβ 25-35 y PrP106-126 reducen la viabilidad celular en células SH-SY5Y tras 16 y 24 horas de tratamiento. La viabilidad celular en los distintos tiempos fue determinada mediante ensayos MTT. La significancia estadística de las diferencias encontradas fue determinada mediante un test de la "t" de dos colas para muestras pareadas, donde ***<0,001. **A)** Viabilidad celular tras la sustitución del suero bovino fetal (FBS), por los suplementos N2 y B27. **B)** Viabilidad celular tras 16 horas de tratamiento con Aβ 25-25, PrP106-126 10 y 50 μM y camptotecina 1μM, como control positivo de muerte celular. **C)** Viabilidad celular tras 24 horas de tratamiento con Aβ 25-25, PrP106-126 10 y 50 μM y camptotecina 1μM.

Además de una reducción patente en el número de células viables, existen cambios morfológicos en las células sometidas a ambos tratamientos, que llevan a pensar que se está dando un proceso de muerte celular.

Para cada una de las condiciones (Aβ 25-35, PrP106-126, camptotecina y control), dosis (10 y 50 μM) y tiempos estimados (16 y 24 horas) se realizaron microfotografías con distintos objetivos (20X y 40X) con el

fin de analizar los cambios morfológicos inducidos por cada uno de los péptidos. Como puede observarse en la figura 7 existen diferencias morfológicas entre las células control y las células tratadas. A las 16 y 24 horas (Figura 7A y 7B respectivamente), las células control presentan una morfología poco diferenciada y se encuentran perfectamente adheridas al sustrato distribuyéndose de forma homogénea en una monocapa. Las células tratadas con camptotecina presentan igualmente en su mayoría una morfología poco diferenciada y una distribución en monocapa, sin embargo parte de ellas presentan menor capacidad de adhesión al sustrato, una morfología redondeada y una mayor capacidad para refractar la luz, lo que es un claro indicativo de que esas células están en proceso de muerte. Esta evidencia se confirma cuando a las 24 horas del tratamiento el 100% de las células ha perdido su capacidad de adhesión, su morfología es redondeada y son totalmente refringentes (Figura 7B). Las células que están en contacto directo con el A β 25-35 presentan variaciones morfológicas que ya son patentes a las 16 horas (Figura 7A) aunque éstas se encuentran adheridas al sustrato se distribuyen en pequeñas agrupaciones y parece sufrir un proceso de maduración morfológica por el cual aparecen extensiones pseudo-neuríticas, con pequeñas protuberancias que parecen formar conexiones sinápticas, señaladas con puntos rojos en las figuras. Este proceso de maduración morfológica ocurre a las dosis empleadas 10 ó 50 μ M y se hace mas patente a las 24 horas de tratamiento (Figura 7B). Es también este el momento en el que muchas de las células adoptan un aspecto muy refringente indicando el comienzo de un proceso de muerte celular. Las células que se encuentran en contacto con el PrP106-126 se comportan de forma similar a aquellas que están en contacto con el A β 25-35, formando pequeñas agrupaciones celulares y sufriendo un proceso de maduración que se hace mas patente a las 24 horas. En definitiva, estos datos parecen demostrar que tanto el péptido amiloide como el prión provocan una disminución drástica de las células viables en cultivo, si bien no permiten asegurar si esta reducción es debida a una parada en la proliferación o a la inducción de un proceso de muerte celular. Para poder resolver esta disyuntiva se realizaron experimentos que permitieron establecer una correlación entre el descenso en la viabilidad celular y los procesos de muerte celular por apoptosis.

A) 20X 40X 16 horas

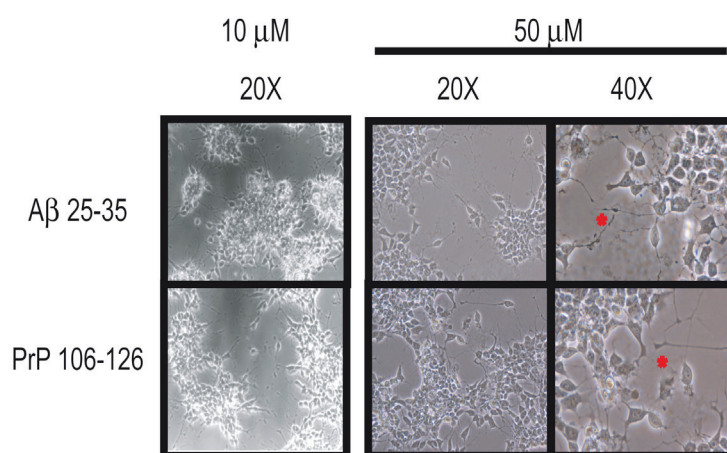
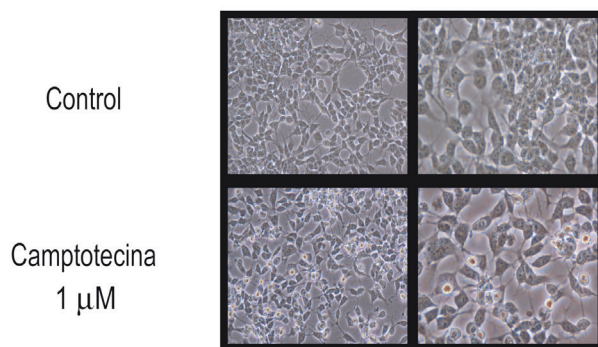
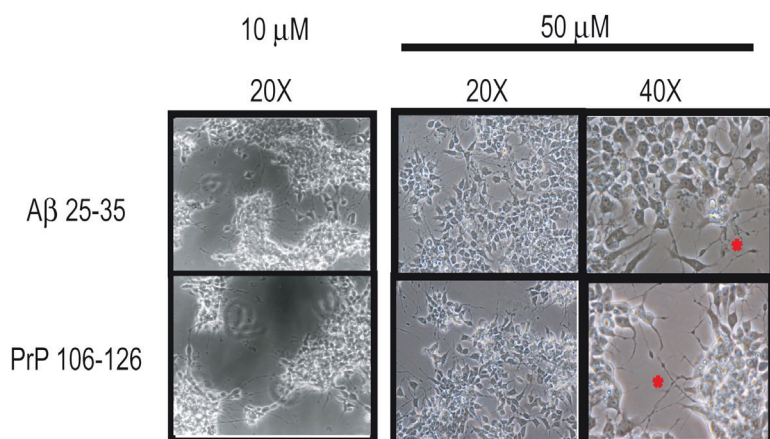
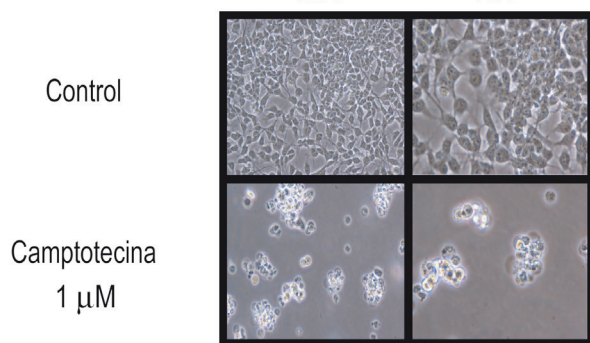


Figura 7. A β 25-35 y PrP106-126 producen cambios morfológicos en células SH-SY5Y. Distintas dosis de cada uno de los péptidos, 10 y 50 μ M, producen variaciones morfológicas en las células. Se generan pequeñas agrupaciones celulares que sufren un proceso de maduración morfológica apareciendo extensiones pseudoneuríticas (asteriscos rojos), muy apreciables en aumentos de mayor tamaño (objetivo 40X) **A)** 16 horas **B)** 24 horas.

B) 20X 40X 24 horas



4.1.2. A β 25-35 y el PrP106-126 activan la expresión de marcadores apoptóticos en células SH-SY5Y.

Con el fin de demostrar cómo la exposición de las células a un insulto tóxico mantenido en el tiempo con A β 25-35 y PrP106-126 conduce al desencadenamiento de la apoptosis y en consecuencia a un descenso en los niveles de viabilidad celular, células SH-SY5Y fueron sometidas a tratamientos de 16 y 24 horas con camptotecina 1 μ M (como control positivo), A β 25-35 ó PrP106-126 (pH:5,5) a dosis 10 y 50 μ M para ambos péptidos. Pasados los tiempos de incubación se procedió a determinar si se había producido el desencadenamiento de la muerte celular programada. Se realizó para ello un estudio de varios parámetros apoptóticos. Por un lado se procedió a la detección de la fragmentación del ADN mediante ensayos TUNEL y por otro lado se estudiaron dos marcadores moleculares de apoptosis, la caspasa 3 activa que se libera como consecuencia de la hidrólisis en un aspártico en la posición 175 de la caspasa 3 en forma de pro-enzima y la hidrólisis de uno de los sustratos fisiológicos de la caspasa 3 cuando ésta se encuentra en forma activa, la enzima nuclear poli-ADP ribosa polimerasa (PARP) implicada en los procesos de reparación por escisión de bases.

La selección de estos parámetros se realizó en base a que éstos han sido ampliamente descritos como marcadores de muerte celular programada en numerosos modelos neurodegenerativos tanto *in vitro* como *in vivo*. Una vez fueron tomadas las microfotografías para todas las condiciones experimentales, se realizaron por un lado ensayos TUNEL, y por otro se obtuvieron extractos proteicos totales que fueron utilizados para hacer ensayos de inmunodetección con anticuerpos con objeto de determinar a nivel molecular si las células que sufrían cambios morfológicos en presencia tanto del A β 25-35 como del PrP106-126, estaban o no sufriendo un proceso de muerte celular programada.

Como puede observarse en la figura 8, existe una clara relación entre la toxicidad inducida por cada uno de los factores y la muerte de las células por apoptosis. Tras 16 horas de exposición a dosis 10 μ M para cada uno de los péptidos empleados, ya se ha producido la fragmentación nuclear tan característica de los procesos apoptóticos, fragmentación que es detectada mediante ensayos TUNEL (Figura 8A). Estos ensayos además de la fragmentación del ADN nos permiten distinguir diferencias morfológicas a nivel nuclear gracias a la tinción DAPI, cuando comparamos las células sometidas a cada uno de los tratamientos respecto a las células control. Mientras las células control presentan núcleos ovalados y de mayor tamaño, las células estimuladas con A β 25-35 o con PrP106-126 presentan un núcleo de menor tamaño en el que la cromatina se encuentra altamente condensada, lo que supone un claro indicativo de que un proceso de muerte celular programada se ha producido (Figura 8A). Así mismo observamos que una exposición con la misma dosis mantenida en el tiempo durante 24 horas permite la detección de la caspasa 3 activa y de la poli-ADP ribosa polimerasa (PARP) (figura 8B). Con estos resultados podemos decir que la exposición mantenida de las células a dosis 10 μ M de cualquiera de los dos péptidos lleva a la muerte de las células por apoptosis. Cuando repetimos las mismas condiciones experimentales empleando dosis de estimulación superiores (50 μ M), se observó de nuevo una activación del programa apoptótico. Tanto a las 16 como a las 24 horas de exposición a cada uno de los péptidos, es posible detectar en extractos proteicos celulares, la caspasa 3 activa, aunque de forma más intensa a las 24 horas (figura 8C y D). La hidrólisis del PARP sin embargo sólo aparece de forma patente tras 24 horas de exposición, aunque esto es de esperar, si tenemos en cuenta que esta enzima constituye uno de los sustratos fisiológicos de la caspasa 3 activa, y sólo cuando los niveles celulares de ésta última son suficientes se produce su hidrólisis, con el fin de ahorrar la energía celular necesaria para facilitar la ejecución de todos los cambios que se producen una vez se ha desencadenado el programa apoptótico.

En base a los resultados obtenidos, se puede determinar que este mecanismo de muerte es dependiente del tiempo de exposición, de forma que a las 16 horas sólo la caspasa 3 comienza a sufrir la proteólisis, mientras que a las 24 horas la hidrólisis de esta caspasa ejecutora es patente y comienza la hidrólisis de la Poli ADP ribosa.

El hecho de que la hidrólisis de la Poli-ADP ribosa a las 24 horas además sea tan sutil, hace pensar que este proceso hidrolítico se puede prolongar en el tiempo, alcanzando su máximo a tiempos posteriores.

En cualquier caso la activación de estos dos parámetros apoptóticos, nos permite asegurar en efecto que tanto el A β 25-35 como el PrP106-126 inducen un daño neurotóxico que lleva a la muerte de las células por apoptosis y a un descenso en la viabilidad celular.

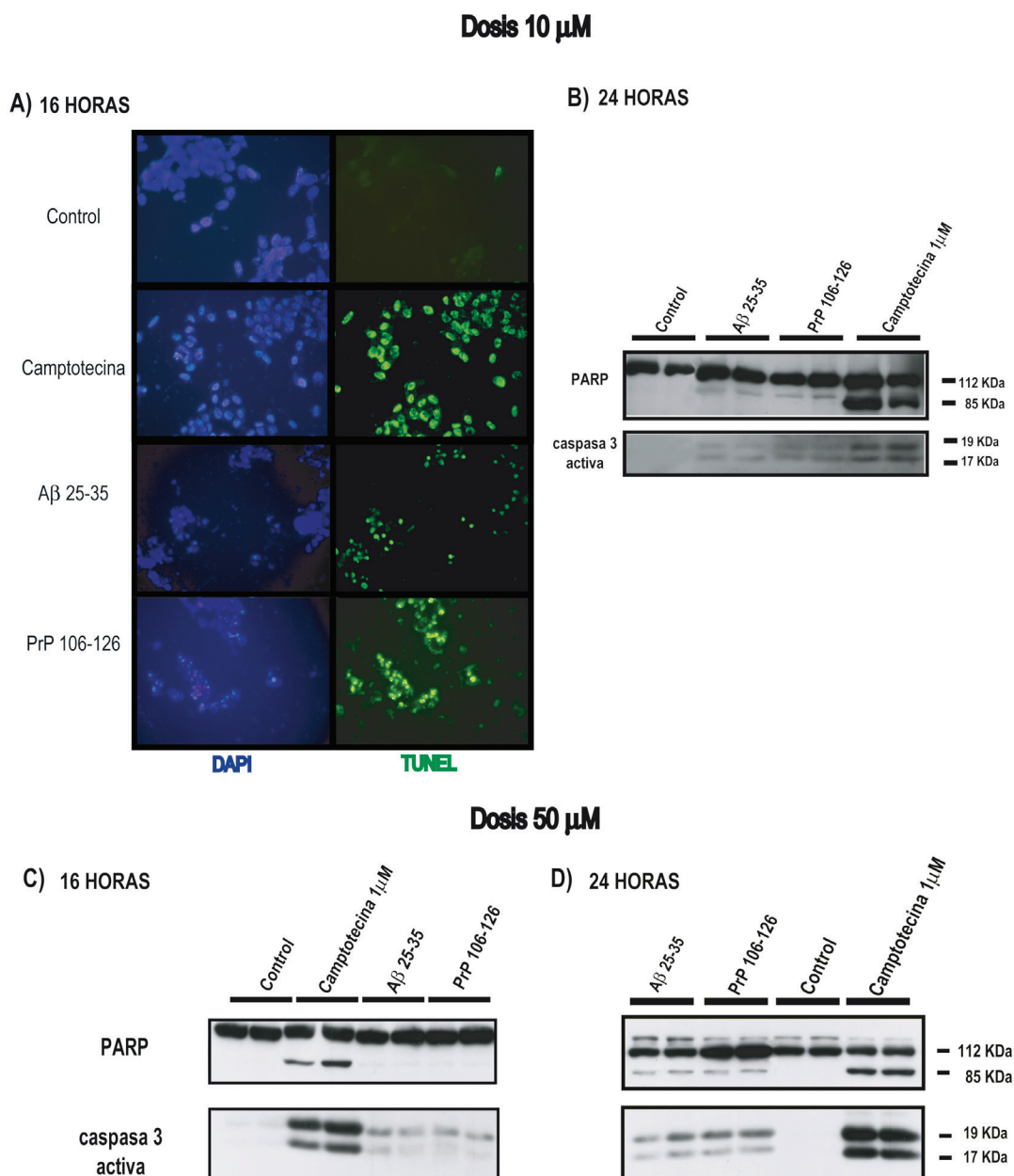


Figura 8. Los péptidos A β 25-35 y PrP106-126 inducen la muerte celular por apoptosis en células SH-SY5Y. A) Ensayo TUNEL en células tratadas durante 16 horas con A β 25-35 y PrP106-126 10 μ M y camptotecina 1 μ M. **B)** Inmunodetección de la caspasa 3 activa y PARP hidrolizado en células tratadas con A β 25-35 y PrP106-126 10 μ M y camptotecina 1 μ M **C)** y **D)** Inmunodetección de la caspasa 3 activa y PARP hidrolizado en células tratadas con A β 25-35 y PrP106-126 50 μ M y camptotecina 1 μ M durante 16 y 24 horas respectivamente. 112/ 85 KDa y 19/17 KDa se corresponden con los pesos moleculares tras la hidrólisis del PARP y la caspasa 3 activa respectivamente.

4.2 Los perfiles de expresión génica asociados a la toxicidad inducida por el A β 25-35 y PrP106-126 presentan numerosos genes, rutas de transducción de señal, funciones moleculares y biológicas reguladas de forma homóloga.

4.2.1. Diseño experimental, hibridación de *microarrays*, controles de calidad y pre-procesamiento de los datos.

Para evaluar los perfiles de expresión génica, se planteó un diseño experimental que permitiera tanto un análisis de los datos como una interpretación de los resultados de forma sencilla y robusta desde el punto de vista estadístico.

Los experimentos en los que se emplean *microarrays* se caracterizan por presentar múltiples fuentes de variación. Por un lado la variación biológica, inherente a todos los organismos influida tanto por factores genéticos como ambientales y por otro lado la variación técnica introducida durante el proceso de extracción, marcaje e hibridación de las muestras. Por ello es fundamental tener en cuenta dichas fuentes de variación en el momento de realizar el diseño experimental, de forma que su desarrollo permita reducir la variabilidad en la medida de lo posible. Esto contribuirá a mejorar la precisión y exactitud del experimento lo que permitirá extraer conclusiones globales y generalizar más allá de las muestras con las que estamos trabajando.

Una forma sencilla de valorar la adecuación de un determinado diseño experimental es tendiendo en cuenta los grados de libertad que posee dicho experimento. Para calcular los grados de libertad, se deben tener en cuenta por un lado el número de unidades experimentales independientes y por otro el número de tratamientos o condiciones experimentales distintas. Así, el número de grados de libertad se obtiene sustrayendo al número de unidades experimentales independientes el número de condiciones experimentales independientes. El número mínimo de grados de libertad que se deben obtener para asegurar un tamaño experimental adecuado son 5 ⁽⁴⁴⁾. Si al realizar la sustracción no existieran grados de libertad, podría no existir información suficiente disponible para poder estimar la varianza biológica, de forma que en un futuro, al aplicar los distintos test estadísticos sólo se estaría evaluando la varianza de tipo técnico, por lo que el alcance de las conclusiones obtenidas quedarían ciertamente muy limitadas a los resultados obtenidos en ese experimento puntual.

En el diseño se partió de doce unidades experimentales independientes (placas de p100), obtenidas a partir de un mismo *pool* inicial de células SH-SY5Y, intentando así que los grupos a comparar fueran lo más homogéneos posible. Las doce unidades experimentales se dividieron al azar en tres grupos distintos en función del tratamiento a recibir, de forma que cuatro de ellas fueron tratadas con PrP106-126 50 μ M, otras cuatro con A β 25-35 50 μ M, y las cuatro restantes se consideraron como un control. Todos los tratamientos se mantuvieron durante seis horas, con el fin de identificar genes regulados transcripcionalmente durante las primeras etapas del proceso de neurotoxicidad, tanto por el PrP106-126 como por el A β 25-35 (Figura 9). Realizados los tratamientos se obtuvieron los ARNs correspondientes a cada unidad experimental.

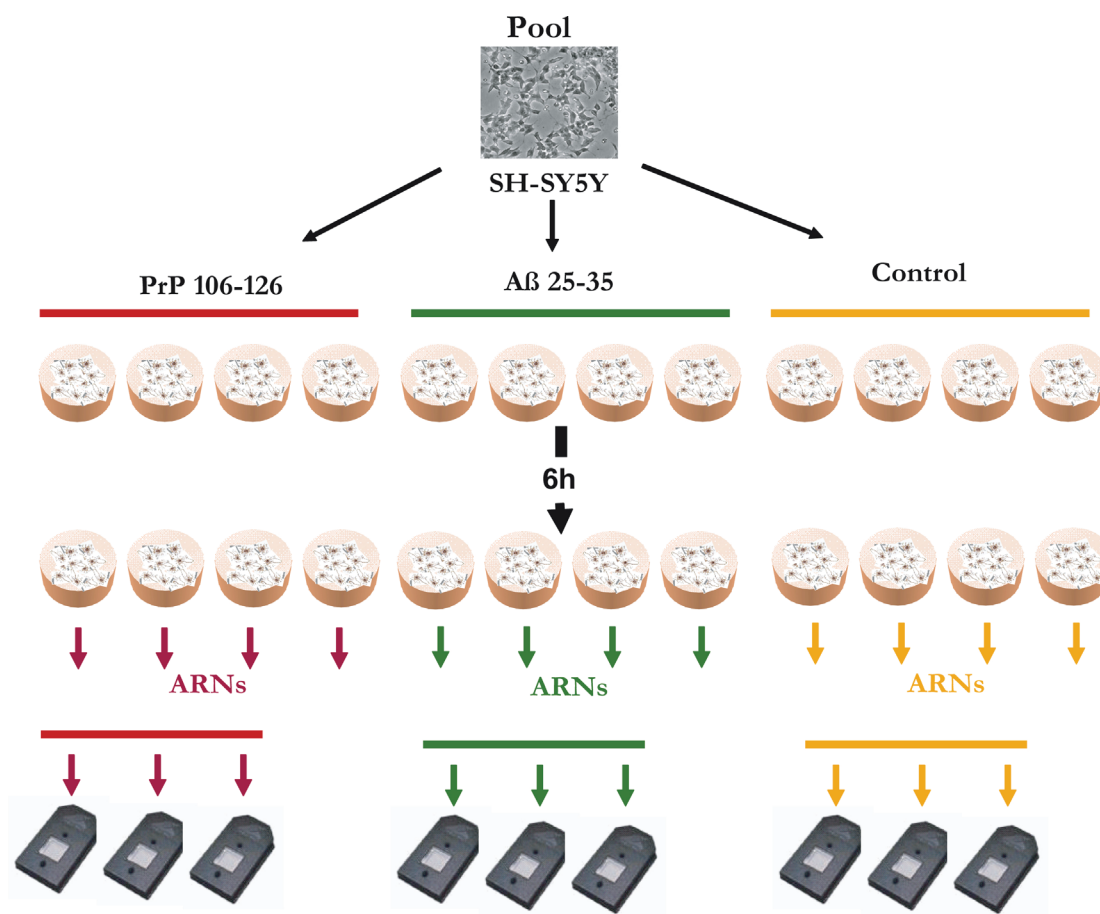


Figura 9. Diseño del modelo experimental. En el diseño se contemplaron doce unidades experimentales independientes obtenidas a partir del mismo *pool* inicial de células SH-SY5Y. Las doce unidades experimentales se dividieron al azar en tres grupos distintos en función del tratamiento a recibir, contando por tanto con tres condiciones experimentales. Cuatro de las doce unidades experimentales fueron tratadas con PrP106-126 50 μ M, otras cuatro con A β 25-35 50 μ M, y las cuatro restantes se utilizaron como un control. Todos los tratamientos se mantuvieron durante seis horas, con el fin de identificar genes regulados transcripcionalmente durante las primeras etapas del proceso de neurotoxicidad. Pasados los tiempos de tratamiento se obtuvieron los ARNs correspondientes a cada unidad experimental y tres de los cuatro ARNs para cada tratamiento se hibridaron con un chip HU133 plus 2.0

Teniendo en cuenta que tanto la cantidad como la calidad del ARN es crucial para la reproducibilidad y el éxito de un estudio de perfil de expresión, se comprobó la integridad de los ARNs purificados corriéndolos en un gel de agarosa al 1% y comprobando la relación de intensidad entre los ARN ribosomales 28S y 18S (Figura 10A). Una vez la integridad de todos los ARNs fue confirmada, tres de los cuatro ARNs para cada tratamiento (aquellos que presentaban una calidad y rendimiento más homogéneos) se utilizaron para sintetizar el ADNc correspondiente a cada una de las muestras.

Así, en nuestro planteamiento experimental y siguiendo estos criterios, si partimos de 9 unidades experimentales independientes y tres condiciones experimentales distintas (A β 25-35, PrP106-126 y control), en total tenemos 6 grados de libertad, con lo que con este diseño experimental estaríamos en el tamaño adecuado para la obtención de datos robustos y a partir de los que se podrían obtener conclusiones experimentales globales.

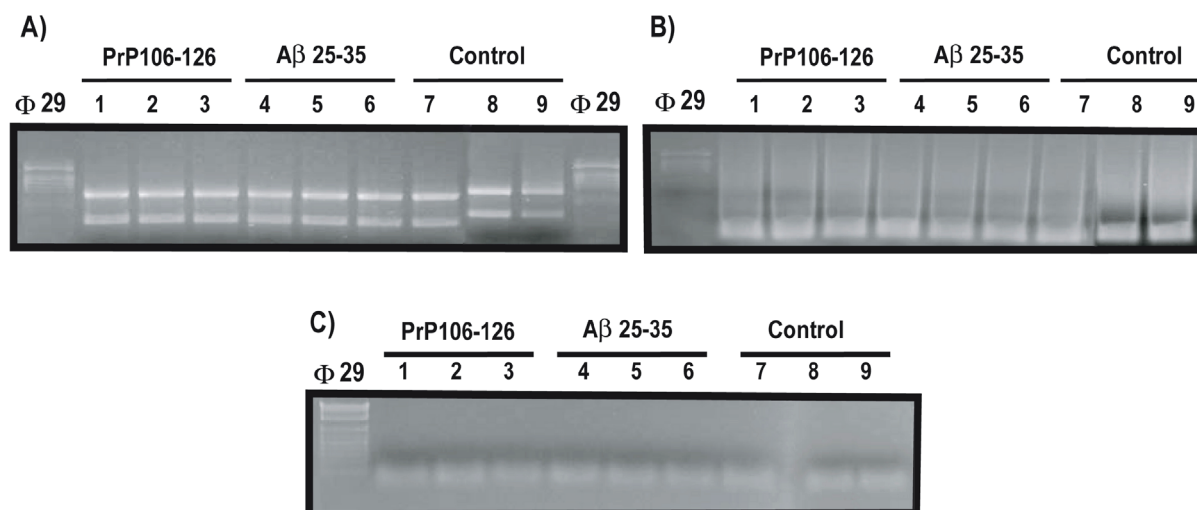


Figura 10. Integridad del ARN total y de los ARNc purificados y fragmentados. A) ARN ribosomales 28S y 18S, reflejo directo de la integridad de los ARNs totales tras su limpieza con el *kit RNEasy*. Se observan dos bandas perfectamente definidas que se corresponden con ARNs ribosomales, lo que indica la buena integridad de las muestras B) ARNc purificados. Se observa un rastro de bandas con un máximo a 2 Kb, lo que indica una integridad adecuada para todos los ARNc. C) ARNc fragmentados con tamaños entre 35-200 nucleótidos capaces de hibridar con las sondas del chip. Para todos los casos se corrieron las muestras en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y como marcador se utilizó el ϕ 29-HindIII (ϕ 29).

Una vez el ADNc fue sintetizado, éste se utilizó como molde para la síntesis del ARNc correspondiente a cada uno de los tratamientos. De la misma forma que para el ARN total, se comprobó tanto la integridad de cada uno de los ARNc (Figura 10B) como sus tamaños tras el proceso de fragmentación (Figura 10C), ya que esto es fundamental para que se de una correcta hibridación de las distintas mezclas con cada uno de los *chips*. Una vez se comprobó que los ARNc correspondientes a cada uno de los tratamientos estaban íntegros y presentaban tamaños entre 35 y 200 nucleótidos, se hibridaron cada uno en un *chip*.

Para comprobar que todos los *arrays* hibridados eran comparables entre sí, se verificaron ciertos parámetros de calidad. Inicialmente se inspeccionaron todas las imágenes correspondientes a cada uno de los *microarrays* para detectar la existencia de posibles artefactos debido a una incorrecta hibridación.

Las imágenes presentaban fondos oscuros y brillantes, con un nivel de ruido de fondo homogéneo (en torno a 60) (Tabla 2) lo que *a priori* indica una buena hibridación de cada uno de los *chips*. Para asegurar sin embargo que los procesos de hibridación, lavado y revelado fueron adecuados, se tuvieron en cuenta los controles de sensibilidad (BioB, BioC, BioD, y cre) introducidos en la mezcla de reacción junto con el ARNc. Éstos estaban presentes en cada uno de los *arrays*, incluso BioB que es el control menos representado, lo que nos permitió confirmar un correcto procesamiento técnico. Otros tres controles de calidad que se tuvieron en cuenta fueron la relación 3'/5' del *GAPDH*, el factor de escalado y el porcentaje de sondas presentes (Tabla 2).

La relación 3'/5' del *GAPDH* presenta un valor medio 1,10, lo que asegura una correcta integridad tanto del ARN como del ARNc, así como una correcta transcripción del ADNc y del ARNc biotinilado. El factor de escalado presenta un valor medio de 1,10 (próximo a 1 y con una variación no superior a 3, entre todos los *chips*), lo que indica tanto la ausencia de variabilidad de las muestras como la integridad de los transcritos utilizados durante el proceso de normalización. Por último el porcentaje de sondas presentes presenta un valor medio del 36% (por encima del 25% recomendado para muestras humanas) lo que asegura que no se ha perdido la representatividad de los transcritos durante el procesamiento de las muestras.

La obtención de valores integrados dentro de los intervalos recomendados por *Affymetrix*, nos permite asegurar que las muestras empleadas presentaban la calidad suficiente como para que los datos obtenidos de cada uno de los *chips* no sólo fueran comparables entre sí sino que también lo fueran respecto a datos obtenidos de posibles futuros experimentos.

Tabla 2. Parámetros de calidad de los *microarrays*

Muestra	Ruido de fondo †	3'/5' <i>gapdh</i> §	Factor escalado ‡	% Presentes ¥
P1	62,97	1,10	1,20	34,60
P2	61,03	1,20	1,40	33,50
P3	51,63	1,13	1,50	34,30
B1	50,77	1,10	1,30	35,90
B2	50	1,08	0,97	39,80
B3	63,13	1,07	0,94	38,90
C1	58,51	1,07	0,94	36,20
C2	60,4	1,11	1,30	33,00
C3	57,17	1,05	0,99	37,00
Media±SD	57,29±4,9	1,10±0,04	1,17±0,2	35,92±2,3

† El ruido de fondo debe presentar valores entre 20 y 100.

§ La relación 3'/5' para el *gapdh* debe ser lo más próxima a 1. Un valor superior a 3 podría ser indicativo de una falta de integridad del ARN o bien que el proceso de la transcripción ha sido ineficiente.

‡ Las diferencias del factor de escalado no deben ser superiores a 3 veces.

¥ El porcentaje de sondas debe ser superior al 25%

Una vez fue confirmado que todo el proceso de hibridación y de obtención de datos cumplía los controles de calidad, se procesaron los datos mediante el procedimiento denominado “Análisis de Expresión Absoluta”, por el cual se realiza un pre-procesamiento seguido del análisis de los datos generados. Inicialmente, a partir de las imágenes obtenidas para cada uno de los *microarrays* se determinó el ruido de fondo que se sustrajo de los valores de intensidad obtenidos a partir de los distintos conjuntos de sondas PM/MM. A continuación, a partir de los valores de intensidad se calculó el valor de señal (que se corresponde con la abundancia relativa del transcrito para cada sonda) y un valor de probabilidad asociado (calculado mediante el estadístico no paramétrico de Wilcoxon) que determina el nivel de significancia estadística para la presencia o ausencia de cada uno de los mensajeros en el experimento.

Finalmente se calculó el nivel de cambio (*fold*) respecto a los controles para cada sonda a partir del SLR (*signal low ratio*), así como un valor de probabilidad asociado, mediante un *test* de la “t” de dos colas, que determinó si el cambio positivo o negativo en los niveles de expresión para cada sonda era o no significativo, considerando significativos aquellos con un p-valor <0, 05. Todos estos parámetros nos permitieron seleccionar aquellos genes significativos que desde el punto de vista estadístico presentan un mayor nivel de cambio significativo respecto al control.

A partir de los datos brutos obtenidos de cada *chip* se redujo la complejidad de la matriz de datos, para ello se eliminaron en primer lugar aquellas sondas que estaban ausentes y que por tanto no eran informativas y en segundo lugar aquellas que presentaban un perfil de expresión plano en las nueve muestras. A continuación se compararon los datos obtenidos en las tres réplicas tratadas con PrP106-126 y con Aβ 25-35 con los obtenidos para las tres réplicas del control (Figura 11).

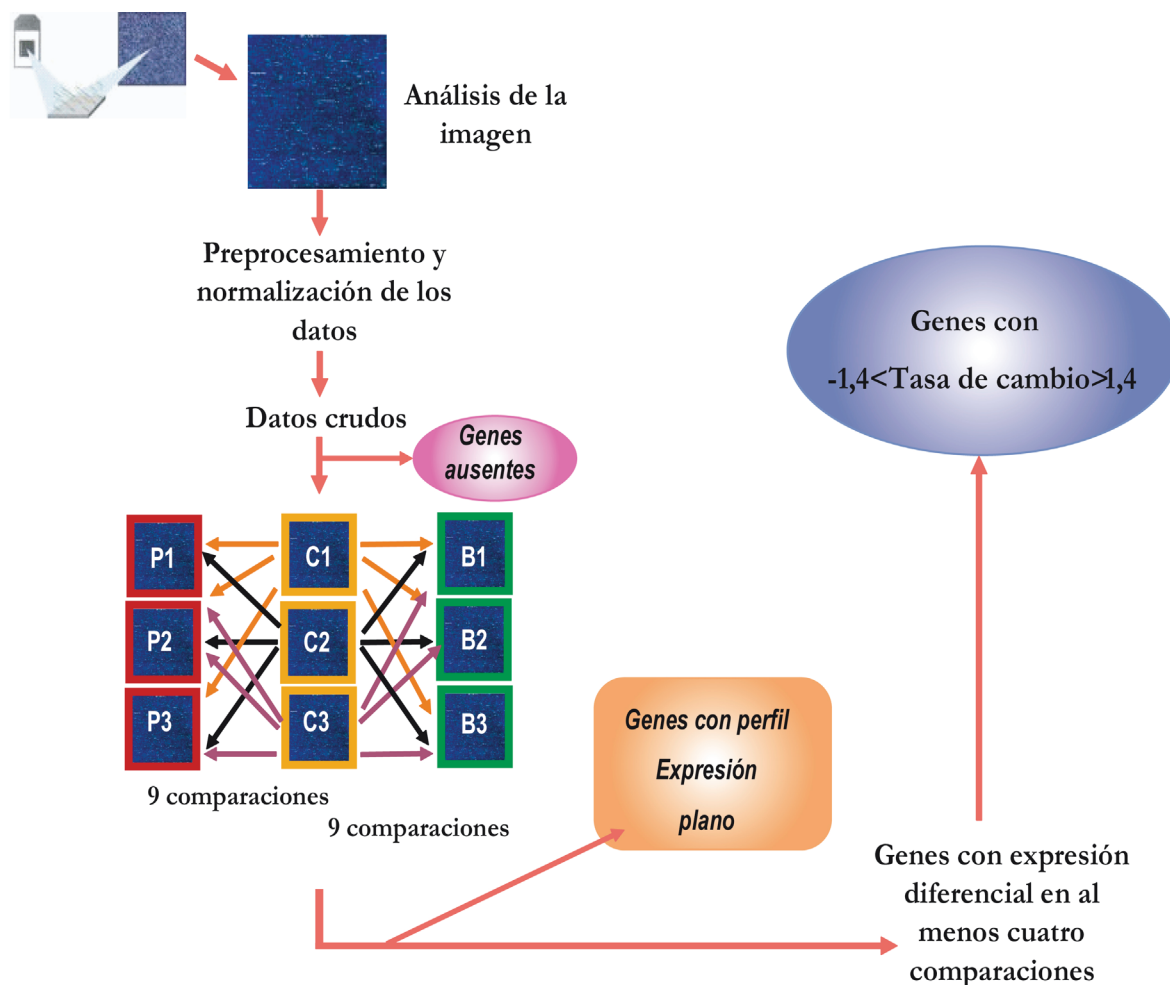


Figura 11. Obtención y procesamiento de los datos. Tras la hibridación de los *microarrays*, se obtiene una imagen fluorescente de los mismos. El procesamiento de esta imagen aporta dos tipos de información para cada uno de los genes representados en el array por cada conjunto de sondas PM/MM. La primera es una información de tipo cualitativo que indica si el gen está o ausente y la segunda es una información de tipo cuantitativo que proporciona un valor numérico directamente proporcional a los niveles de expresión del gen. Una vez la imagen ha sido transformada a valores de expresión, se realiza un procesamiento y normalización de los datos que permite la obtención de un grueso de datos de expresión. Para su procesamiento se realizó un filtrado secuencial de los datos. Inicialmente se descartaron aquellas sondas ausentes en todos los chips. A continuación se realizaron todas las comparaciones posibles para cada una de las condiciones experimentales (PrP106-126 ó A β 25-35) respecto al control, se eliminaron aquellas sondas que presentaban un perfil de expresión plano respecto al control y se seleccionaron aquellas que presentaban una expresión diferencial en al menos cuatro de las nueve comparaciones posibles. Finalmente dentro de las sondas que cumplían, estas condiciones se eligieron aquellas que presentaban se eligieron aquellas que presentaban una tasa de cambio $< 1,4$ ó $> 1,4$

Existían pues, nueve comparaciones posibles para cada tratamiento (tres muestras tratadas contra tres muestras controles de las que obtuvimos un grupo de genes significativamente sobreexpresados y otro grupo de genes significativamente reprimidos. En primer lugar se seleccionaron aquellos transcritos que se encontraban sobreexpresados o reprimidos por el tratamiento con el PrP106-126 o con A β 25-35 en un mínimo de cuatro comparaciones para cada tratamiento. Realizado este primer filtro se seleccionaron a continuación aquellos genes que presentaban una tasa de cambio o *fold* con valor ≥ 1.4 ó ≤ -1.4 en el caso de los genes sobreexpresados o reprimidos, respectivamente (Figura 11). A partir de estos criterios de selección, podemos describir cuatro grupos

de genes: Genes sobreexpresados por el A β 25-35, genes reprimidos por el A β 25-35, genes sobreexpresados por el PrP106-126 y genes reprimidos por el PrP106-126. Estos grupos en su conjunto constituyen los perfiles de expresión génica asociados a cada uno de los tratamientos.

4.2.2. Análisis e integración funcional de los perfiles de expresión génica asociados a la toxicidad inducida por el A β 25-35 y por el PrP106-126.

4.2.2.1. Análisis descriptivo.

El estudio detallado de los perfiles de expresión génica asociados a la toxicidad inducida por el PrP106-126 y por el A β 25-35, junto con la integración de los mismos en procesos funcionales y moleculares, permite un estudio global de los cambios acontecidos en esas circunstancias. Esto nos permite valorar si el efecto asociado a la toxicidad de ambos péptidos presenta factores en común que afectan de forma similar a distintos procesos biológicos, celulares o moleculares, o bien si, por el contrario, presenta vías de actuación diferentes, a pesar de producir el mismo resultado final, la muerte celular por apoptosis.

Tanto el A β 25-35 como el PrP106-126 producen alteraciones en los niveles de expresión génica, de forma que de las 55.000 sondas representadas en el *Human Genome U133 Plus 2.0 array*, un 1,62 % (893 sondas de 55.000) estaban sobreexpresadas y un 4,81% reprimidas por el efecto del PrP106-126 (2646 de 55.000), mientras que un 4,14%, estaban sobreexpresadas (2279 de 55.000) y 3,62% (1990 de 55.000) reprimidas de forma significativa por el efecto del A β 25-35. Al observar los datos desde un punto de vista global es interesante reseñar el carácter modesto de los niveles de cambio encontrados para gran parte de las sondas, no pasando en una gran proporción de valores próximos a 2. Aunque está muy extendida la idea de que cambios en los niveles de expresión grandes se traducen en un gran cambio fisiológico o una significancia patológica mayor, esto no siempre es así. Son muchos investigadores los que toman como referencia de corte relaciones de expresión mayor o iguales a 2. En muchos casos, un pequeño cambio con tasas de cambio inferiores a 2 en un determinado gen puede tener importantes efectos sobre el balance molecular en un determinado proceso biológico o patológico, por ser un gen con gran peso específico en los procesos o rutas en los que se encuentra implicado. Esto es algo que ocurre por ejemplo con los factores de transcripción, que con pequeños cambios en su expresión pueden producir importantes efectos biológicos aun cuando sus niveles de cambio en la expresión sean inferiores a 2. Por esta razón es importante llevar a cabo un análisis exhaustivo y meticuloso de los datos que evite, en la medida de lo posible, perder la menor cantidad de información dentro de la maraña de datos obtenidos, sobre todo en aquellos casos como éste, en los que el efecto estudiado produce cambios de pequeña magnitud. El total de genes regulados por cada uno de los péptidos puede consultarse en el *Anexo I_Listas de Genes*.

El análisis comparativo de los distintos grupos de sondas reguladas respecto a su comportamiento (Figura 12) permite llegar a dos claras conclusiones. La primera de ellas es la existencia de un bajo número de falsos positivos en el experimento planteado, de forma que sólo el 0,51% de las sondas reguladas por el efecto del PrP106-126 (18 de 3539) y el 3,06% de las reguladas por el A β 25-35 (131 de 4269), se encuentran reprimidas en algunas comparaciones y aumentadas en otras (Figura 12A). Esta pequeña cantidad de falsos positivos nos indica en cierto modo que la fiabilidad de los datos obtenidos es adecuada para la obtención de resultados reales. La segunda conclusión obtenida del estudio detallado de estos datos es que ciertamente existe una correlación en el comportamiento de gran parte de las sondas para los dos tratamientos realizados. Así el 31,7% de las sondas significativamente reguladas por el tratamiento con el PrP106-126 (1122 de 3539) y el 26,28% de las reguladas

por el tratamiento con A β 25-35 (1122 de 4269), presentan el mismo sentido de cambio por ambos tratamientos (Figura 12B). De todos modos, el 68,29% (2417 de 3539) y el 73,71% (3147 de 4269) de las sondas reguladas lo son exclusivamente por el tratamiento con el PrP106-126 o por el tratamiento con A β 25-35 respectivamente (Figura 12A y B). Aunque vemos que existen genes con un comportamiento similar respecto al sentido del cambio en ambos grupos experimentales, es mayor el número de genes regulados específicamente por cada uno de los péptidos empleados.

A. Sondas totales reguladas por cada tratamiento

	PrP106-126	A β 25-35
Sobreexpresadas	893	2279
Reprimidas	2646	1990
Total	3539	4269
Falsos positivos	18	131

B. Comportamiento comparativo entre PrP106-126 y A β 25-35

	Homólogo	Regulación exclusiva	
		PrP106-126	A β 25-35
Sobreexpresadas	276	617	2003
Reprimidas	846	1800	1144
Total	1122	2417	3147

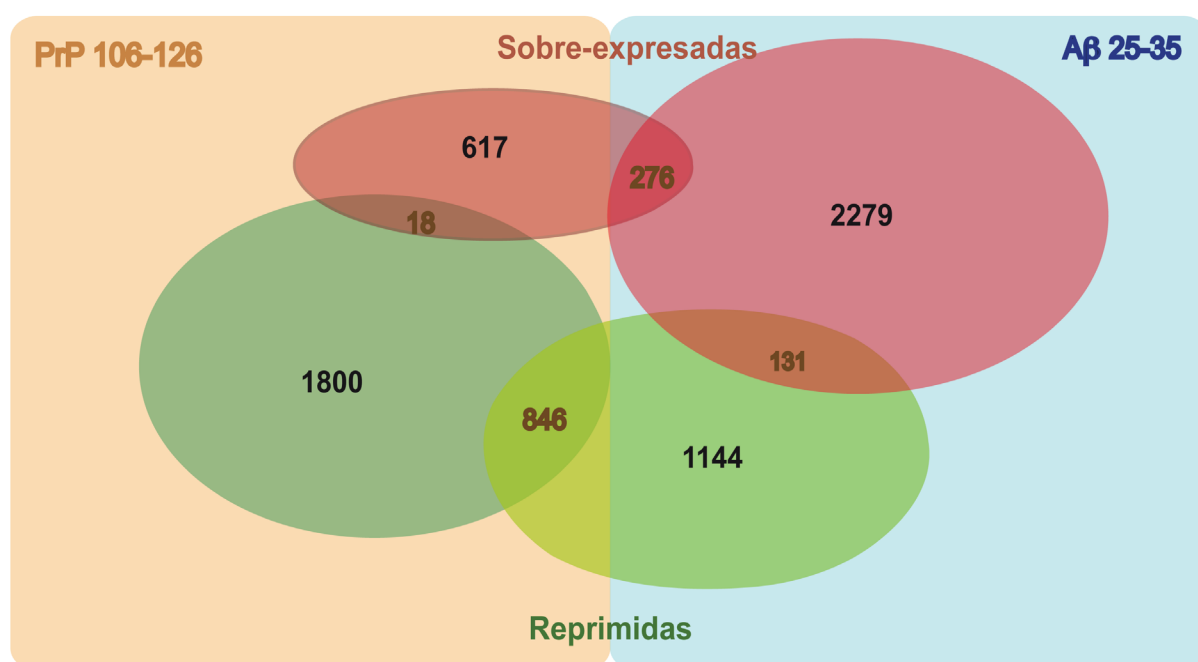


Figura 12. Análisis comparativo de los grupos de sondas reguladas. A) Sondas reguladas, tanto sobre-expresadas como reprimidas, por efecto del PrP 106-126 y del A β 25-35. Igualmente se incluyen aquellas sondas que por presentar a la vez comportamientos opuestos para el mismo tratamiento, constituyen los falsos positivos. **B)** Sondas reguladas que presentan un comportamiento homólogo por efecto de cada tratamiento, o bien aquellas que se expresan exclusivamente por efecto del PrP106-126 ó del A β 25-35.

4.2.2.2. Análisis de Ontología Génica: Procesos Moleculares, Funciones biológicas, Rutas de transducción y regulación transcripcional.

Los genes no funcionan de forma aislada en la célula sino que forman parte de una sofisticada red de interacciones que aún hoy sigue sin ser completamente conocida. De hecho estas complejas interacciones establecidas entre la expresión de los genes en las distintas rutas biológicas se pone de manifiesto de forma fehaciente en distintos contextos biológicos, de manera que son requeridas tanto para una correcta homeostasis en la célula como en los procesos patogénicos. La utilización cada vez más extendida de técnicas experimentales que permiten la obtención de datos a gran escala entre las que se encuentran los *microarrays* ha generado una clara necesidad de trabajar con métodos y herramientas que permitan entender e integrar la ingente cantidad de información generada con este tipo de plataformas desde el punto de vista global de la Biología de sistemas. La interpretación adecuada de los experimentos requiere una anotación funcional en un contexto biológico en el cual las propiedades colectivas de un grupo de genes sean tenidas en cuenta para conseguir la agrupación de los mismos respecto a los distintos niveles de abstracción de una función biológica, un proceso molecular o una ruta biológica. Para poder llevar a cabo el enriquecimiento funcional de los grupos experimentales descritos en este trabajo se utilizaron distintas herramientas de Ontología Génica que permitieron anotar en un contexto biológico y funcional la mayoría de los genes integrados de forma significativa en cada grupo experimental. Entre las interfaces disponibles para este propósito empleamos *Onto-Tools* y *Babelomics*. Para llevar a cabo la anotación funcional, se emplearon todos aquellos genes significativamente regulados respecto al control para cada uno de los tratamientos incluyendo tanto los genes con altas tasas de cambio como los que presentaban las más discretas. Esto nos permitirá esbozar el contexto biológico y de cada una de las condiciones experimentales de una forma más real. Dentro de estas dos interfaces son tres las herramientas que utilizamos, *Onto-Express*, *Pathway-Express* y *FatiGO*. *Onto-Express* nos ha permitido ver que procesos biológicos, moleculares y componentes celulares se encuentran representados significativamente entre los genes regulados, *Pathway-Express* nos ha permitido ver las rutas de transducción significativamente alteradas y *FatiGO* nos ha permitido determinar cuales son las posibles modificaciones a nivel transcripcional, mediadas por determinados factores de transcripción sobre los grupos de genes cuyos niveles de expresión se ven modificados por la presencia de cada uno de los péptidos.

Uno de los principales problemas en el análisis de los datos provenientes de *microarrays* a la hora de integrar en categorías funcionales, es el hecho de que numerosas hipótesis son testadas simultáneamente. La evaluación de la expresión diferencial de cada gen en el *array* implica una hipótesis y teniendo en cuenta que el número de genes representados en un *array* se encuentra en el orden de los miles, aceptamos que cada hipótesis implica la asunción de un falso positivo para cada gen evaluado. Así, cuando varias hipótesis son testadas en paralelo el número de falsos positivos aumenta, por ello es necesario aplicar un factor corrector en el momento de calcular la significancia para un determinado proceso en las condiciones experimentales estudiadas tanto para determinar la expresión diferencial de los genes como para su anotación en integración funcional. Empleamos por tanto métodos de corrección para test múltiples, disponibles en los tres programas empleados, para llevar a cabo el enriquecimiento funcional de nuestros datos. A pesar de que existen numerosos métodos de corrección para test múltiples, hemos decidido utilizar la corrección por FDR (*False Discovery Rate*) ⁽¹⁴⁾ que por un lado asume la existencia de variables dependientes en las condiciones experimentales empleadas, algo apropiado en los experimentos de *microarrays*, en los que se recogen miles de genes entre los que existen complejos mecanismos regulatorios, y por otro lado son menos conservadoras que otras correcciones para test múltiples; correcciones tan restrictivas que nos llevaría a perder gran parte de la información biológica en el caso de ser empleadas. La corrección FDR es una de las correcciones mas adecuadas para este tipo de experimentos, asumiendo como

tasa de error experimental de amplio rango (FWER) del 5%, considerando entonces significativos todos aquellos procesos con un valor $FDR < 0,05$. Para todas las hipótesis experimentales presentadas, se ofrecerá un valor para test simples (p-valor) y un valor para test múltiples (FDR). Aunque nuestro valor de corte vendrá dado por el FDR, incluimos el valor para test simples, pues nos puede aportar información biológica acerca de los procesos que se están produciendo. Siempre que observemos el valor para test simples tendremos presente que puede estar incrementando el error de tipo I por la evaluación de la hipótesis de miles de genes a la vez, con lo que el riesgo de aparición de un falso positivo podría también aumentar. En estas circunstancias tendremos que asumir por tanto el riesgo de que unos determinados genes se hayan agrupado como consecuencia del azar y no sea un proceso significativo en sí mismo. Por todo lo expuesto anteriormente, aún cuando tengamos unas hipótesis experimentales de trabajo de partida obtenidas de ensayos *in silico*, siempre nos veremos en la obligación de confirmar por técnicas alternativas si el tipo de ruta o relación biológica establecida a partir de estas herramientas está alterado o no realmente.

Para poder traducir las listas de genes diferencialmente expresados en un perfil funcional que facilite un mejor entendimiento de los mecanismos biológicos y patogénicos subyacentes en los distintos grupos experimentales se empleó inicialmente el programa Bioinformático *OntoExpress* mediante el cual los distintos genes regulados de forma significativa por cada uno de los factores (A β -Reg o PrP-Reg) se agruparon en distintas categorías ontológicas en base a distintos procesos moleculares y funciones biológicas perfectamente caracterizadas respecto sus distintos niveles de detalle o abstracción.

Para cada grupo de genes se obtuvo un diagrama de barras que representa todos y cada uno de los categorías funcionales moleculares y biológicas y componentes celulares enriquecidos en los grupos experimentales sometidos a estudio. Cada una de las categorías funcionales viene determinada por dos valores de significancia obtenidos a partir de una distribución Hipergeométrica: un p-valor para test múltiples (FDR-corrected *p-value*) y p-valor para hipótesis simples (p-value), considerando significativos aquellos procesos con valores de probabilidad inferior-iguales a 0,05. De la misma forma cada proceso está representado por el número de genes regulados e incluidos en cada una de las categorías funcionales (Total) y el porcentaje que representa respecto al total de genes incluidos en la misma (%G).

Para los dos grupos experimentales se obtuvieron resultados en 3 niveles de abstracción o detalle: procesos moleculares, biológicos y componente celular.

Cuando observamos el diagrama de barras obtenido para las funciones moleculares en un nivel de abstracción bajo (figura 13), vemos que existen numerosos procesos enriquecidos para cada uno de los grupos experimentales de forma significativa, y cuando comparamos estos procesos para cada uno de los factores (A β o PrP) vemos que son pocos los procesos comunes (barras moradas) y que se tratan de categorías bastante generales que agrupan genes que codifican proteínas con capacidad de unión a ARN (4,03% A β -Reg y 5,4% PrP-Reg), con capacidad a ácidos nucleicos (9,31% A β -Reg y 12,17% PrP-Reg), con capacidad de unión a proteínas (25,45 % A β -Reg y 28,9% PrP-Reg) genes con actividad de receptor acoplada a proteínas G (0,81% A β -Reg y 0,53% PrP-Reg) y por último genes que aún no presentan una anotación funcional (*UnknownF*) (33,53 % A β -Reg y 29,733% PrP-Reg). Es mayor el número de grupos enriquecidos de forma diferencial para cada uno de los dos factores que el número de grupos comunes. Así encontramos representados de forma significativa para el A β distintas categorías funcionales: Genes que codifican proteínas con capacidad de unión a cromatina (0,83%), a actina (1,7%), con capacidad de dimerizar (0,59%), de actuar como coactivadores transcripcionales (1%) y como represores transcripcionales (0,75%). Entre las categorías funcionales representadas de forma significativa

en los genes regulados por PrP encontramos: genes que codifican proteínas con capacidad de unir ATP (8,31 %), Zinc (12,31%), iones metálicos (12,39%), GTP (2,29%), ADN (7,02%), proteínas mal plegadas (0,9%), a proteínas *heat shock* (0,62%) , a receptores de andrógenos (0,36%), a dominios proteicos específicos(0,53%), genes que codifican proteínas con actividad transferasa (7,06%), ubiquitina proteína ligasa (1,17%), ubiquitina tiolesterasa (0,7%), ligasa (2,07%), helicasa ATP-dependiente (0,62%) , serin endopeptidasa (0,17%), inhibidora de caspasas (0,2%), cisteina peptidasa (0,62%) para heterodimerizar proteínas (1,2%), actividad transductora de señal (1,68%) y genes que codifican proteínas constituyentes del ribosoma (1,15%). Todos los genes expresados diferencialmente y agrupados en cada una de las categorías se recogen en los *Anexos II (Resultados-Aβ)* y *III (Resultados-PrP)*(pestañas 1 y 2). En éstos, cada categoría enriquecida viene marcada en gris con su valor de significancia estadística tanto para test simples (*p-value expanded*) como múltiples (*p-value corrected*) y recoge todos aquellos genes diferencialmente expresados que se agrupan en la misma con su correspondiente

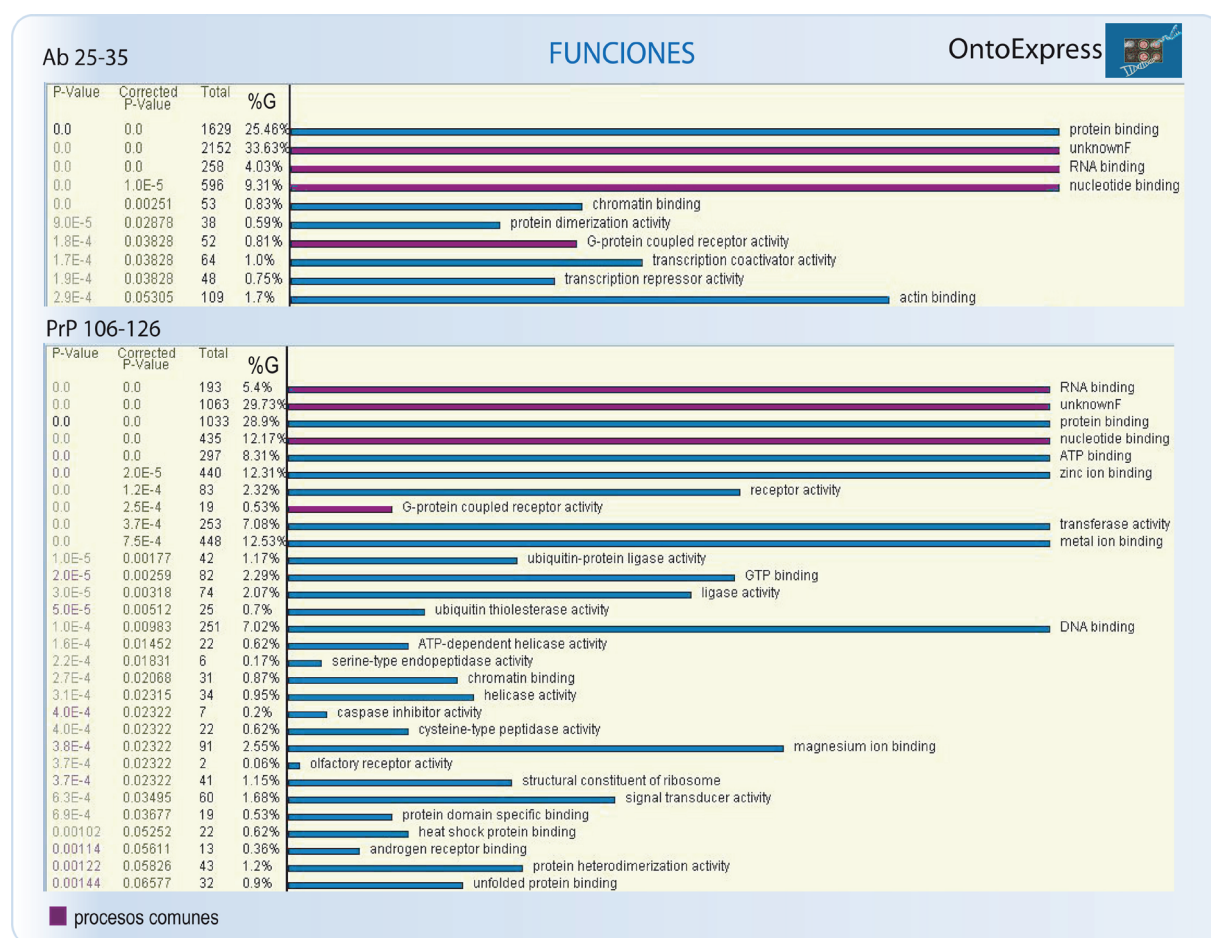


Figura 13. Funciones moleculares representados de forma significativa entre los genes regulados por el Aβ 25-35 y el PrP106-126. Cada diagrama de barras incluye las funciones moleculares representadas de forma significativa para ambos péptidos, ordenados de forma creciente en función del valor de significancia estadística. Cada uno de los procesos viene determinado por dos valores de probabilidad: un p-valor para hipótesis simples (*P-value*) y un valor ajustado para test múltiples o FDR, calculado mediante una distribución hipergeométrica (*Corrected P-value*). Se consideran significativos aquellos procesos con FDR<0,05. De la misma forma para cada proceso se indica el número de genes regulados incluidos en cada una de las categorías (Total), así como el porcentaje que representa respecto al total de genes incluidos en el proceso (%G).

identificación para Locuslink (*Locuslink ID*) y su tasa de cambio (*Expression value*).

De la misma forma cuando observamos el diagrama de barras para los procesos biológicos (Figura 14) de nuevo encontramos pocos procesos enriquecidos comunes (barras moradas) y bastante generales entre los que encontramos genes con anotación funcional desconocida (37,27% A β -Reg y 33,93% PrP-Reg), implicados en la transcripción (7,75% A β -Reg y 8,78% PrP-Reg), y el procesamiento del ARN (1,72% A β -Reg y 2,32% PrP-Reg). Igualmente encontramos genes que codifican proteínas con función de receptor y acopladas a proteínas G (0,98% A β -Reg y 0,92% PrP-Reg), implicados en la regulación transcripcional dependiente de la RNA polimerasa II (1,13% A β -Reg y 1,45% PrP-Reg) genes implicados en la división celular (1,48% A β -Reg y 2,15% PrP-Reg), en ciclo celular (2,38% A β -Reg y 3,72% PrP-Reg) en mitosis (1,16% A β -Reg y 1,71% PrP-Reg) y en la transición de G1/S dentro del programa de división celular mitótico (0,42% A β -Reg y 0,62% PrP-Reg).

Entre los grupos enriquecidos específicamente para cada una de las condiciones experimentales encontramos genes agrupados por su implicación en la regulación transcripcional dependiente de ADN (8,97%), en la interacción interespecífica entre organismos (1,63%) y en la organización del huso mitótico (1,16%) en el caso del A β -Reg y el procesamiento de los ARN mensajeros (1,73%), el procesamiento de ARN mensajeros nucleares (1,15%), la reparación del ADN (1,4%), el arresto del ciclo celular (1,01%), respuesta a daño en el ADN (1,62%), genes implicados en el transporte intracelular (0,36%) y transporte mediado por vesículas desde el retículo endoplásmico a golgi (0,5%), genes implicados en los procesos catabólicos proteicos dependientes de modificaciones (2,43%), en procesos catabólicos mediados por ubiquitina (1,48%) y en procesos proteolíticos (0,95%) para los genes PrP-Reg. Todos los genes expresados diferencialmente y agrupados en cada una de las categorías se recogen en los *Anexos II_Resultados_A β* , y *III_Resultados_PrP* (pestañas 3 y 4) con los mismos parámetros indicados anteriormente.

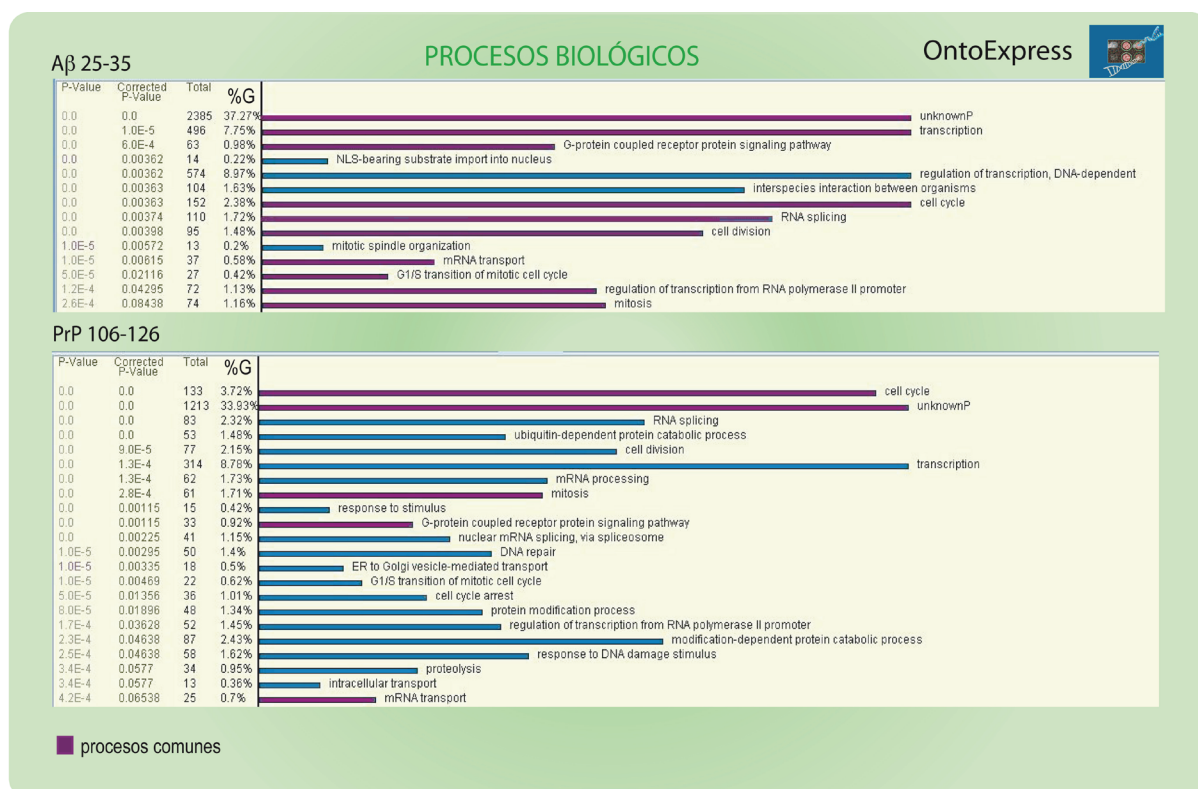


Figura 14. Procesos biológicos representados de forma significativa entre los genes regulados por el A β 25-35 y el PrP106-126. Cada diagrama de barras incluye los procesos biológicos representados de forma significativa para ambos péptidos, ordenados de forma creciente en función del valor de significancia estadística. Cada uno de los procesos viene determinado por dos valores de probabilidad: un p-valor para hipótesis simples (*P-value*) y un valor ajustado para test múltiples o FDR, calculado mediante una distribución hipergeométrica (*Corrected P-value*). Se consideran significativos aquellos procesos con FDR<0,05. De la misma forma para cada proceso se indica el número de genes regulados incluidos en cada una de las categorías (Total), así como el porcentaje que representa respecto al total de genes incluidos en el proceso (%G).

Cuando analizamos en detalle el diagrama de barras para el componente celular (Figura 15), nos proporciona información acerca del enriquecimiento de los genes alterados por cada uno de los péptidos empleados en función de su distribución dentro de los distintos compartimentos y espacios celulares. Entre los compartimentos comunes para ambos péptidos encontramos el citoplasma (22,1% A β -Reg y 24,9% PrP-Reg), el citosol (4,49% A β -Reg y 6,43% PrP-Reg), la membrana del retículo endoplásmico (2,83% A β -Reg y 3,41% PrP-Reg), la región extracelular (5,49% A β -Reg y 3,69% PrP-Reg), el núcleo (25,54% A β -Reg y 30,57% PrP-Reg), el poro nuclear (0,72% A β -Reg y 0,95% PrP-Reg) el retículo endoplásmico (4,49% A β -Reg y 5,59% PrP-Reg), Golgi (4,2% A β -Reg y 5,02% PrP-Reg), el spliceosoma (0,92% A β -Reg y 1,09% PrP-Reg), el melanosoma (0,61% A β -Reg y 0,78% PrP-Reg) la cromatina (0,47% A β -Reg y 0,67% PrP-Reg) y el huso mitótico (0,52% A β -Reg y 0,67% PrP-Reg).

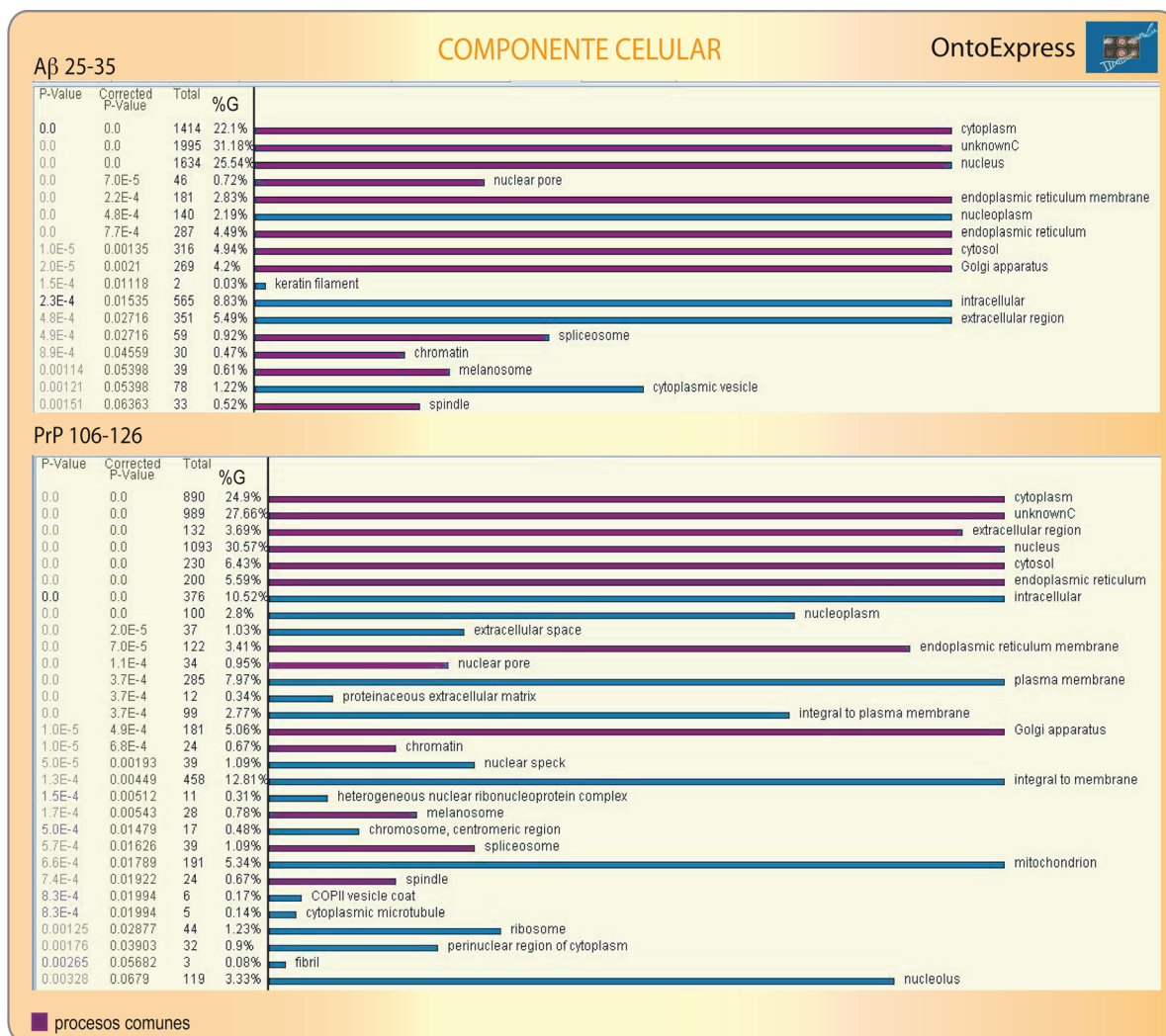


Figura 15. Componentes celulares representados de forma significativa entre los genes regulados por el A β 25-35 y el PrP106-126. Cada diagrama de barras incluye los componentes celulares representados de forma significativa para ambos péptidos, ordenados de forma creciente en función del valor de significancia estadística. Cada uno de los procesos viene determinado por dos valores de probabilidad: un p-valor para hipótesis simples (*P-value*) y un valor ajustado para test múltiples o FDR, calculado mediante una distribución hipergeométrica (*Corrected P-value*). Se consideran significativos aquellos procesos con FDR<0,05. De la misma forma para cada proceso se indica el número de genes regulados incluidos en cada una de las categorías (Total), así como el porcentaje que representa respecto al total de genes incluidos en el proceso (%G).

Entre los compartimentos celulares enriquecidos específicamente para los genes A β -Reg y PrP-Reg (Figura 15) encontramos, el nucleoplasma (2,19%), los filamentos de queratina (0,03%), y las vesículas citoplásmicas (1,22%). En el caso de los genes PrP-Reg encontramos el nucleoplasma (2,8%), el espacio extracelular (1,03%), la membrana plasmática (7,97%), la matriz extracelular proteica (0,34%), el espacio integral hacia la membrana plasmática (7,97%), el complejo heteroribonucleoproteico nuclear (0,31%), la región cromosómica centromérica (0,48%), la mitocondria (5,34%), las vesículas COPII (0,17%), los microtúbulos centroméricos (0,14%), los ribosomas (1,23%), la región citoplásmica perinuclear (0,9%) y el nucleolo (3,33%). Al igual que para los procesos moleculares y biológicos, todos los genes expresados diferencialmente y agrupados en cada una de las categorías se recogen en los *Anexos II (Resultados-A β)* y *III (Resultados-PrP)* (pestañas 5 y 6) con los mismo parámetros indicados anteriormente.

Una vez se analizó el enriquecimiento en distintos procesos moleculares, biológicos y componentes celulares se realizó un análisis en profundidad de las posibles rutas biológicas que podían estar alteradas por el efecto de cada uno de los péptidos (Figura 16). Para ello se empleó el software *Pathway-Express* implementado en la interfaz Onto-tools que permite obtener una representación gráfica de las rutas enriquecidas entre los genes diferencialmente expresados para cada condición experimental. Además de la representación gráfica en formato de barras, se genera una representación de la ruta recogiendo tanto los genes que la componen, además de resaltar aquellos que se expresan diferencialmente en la misma. Siguiendo la misma línea de trabajo se representan los resultados en diagramas de barras, en los que aparecen distintos conceptos que permiten valorar la significancia estadística de un proceso así como el impacto biológico que podría tener la alteración de cada una de las rutas enriquecidas. *Pathway Express* permite realizar un análisis de enriquecimiento clásico partiendo de las rutas biológicas publicadas en distintas bases de datos como KEGG, Biocarta y CellMap. Este enriquecimiento está basado en la aplicación de una distribución hipergeométrica y una posterior corrección por FDR con el fin de identificar aquellas rutas que contienen una proporción de los genes diferencialmente expresados que es significativamente distinta de lo que se esperaría sólo como resultado del azar. Finalmente dos valores de probabilidad son obtenidos, un p-valor para hipótesis simples: *Raw Hypergeometric p-value* y un valor de probabilidad para test múltiples: *Corrected Hypergeometric p-value*, equivalente al FDR explicado anteriormente. Este último será el valor de probabilidad de corte (*Corrected Hypergeometric p-value* <0,05) que empleamos para determinar aquellos procesos estadísticamente significativos, aunque también incluimos aquellos significativos para el *Raw Hypergeometric p-value* <0,05, pero al igual que para los procesos moleculares y biológicos, siempre teniendo en cuenta la posibilidad de aumento de error tipo I y en consecuencia de los posibles falsos positivos. Además del valor de probabilidad para determinar la significancia estadística para cada una de las rutas aparece un nuevo concepto, el factor de impacto (IF) junto con su valor de probabilidad que determina la significancia estadística del mismo, lo que permite determinar por tanto si este valor es producto del azar o no. El factor de impacto (IF) de una ruta en conjunto es calculado a partir de un término probabilístico que toma en consideración, por un lado la proporción de genes diferencialmente expresados en una ruta y un factor de perturbación asociado a cada uno de los genes que componen la ruta, en función del peso específico de cada uno de ellos dentro de la misma. Para su cálculo se incorporan parámetros como la tasa de cambio normalizada para cada gen diferencialmente expresado en la ruta, la significancia estadística del conjunto de los genes que componen la ruta y la topología de la misma. El IF lleva asociado igualmente dos valores de probabilidad que determinarán la significancia de este parámetro para hipótesis simples (*Raw IF análisis p-value* <0,05) y múltiples (*Corrected IF analysis p-value* <0,05).

Una vez se obtuvieron aquellas rutas enriquecidas entre los genes diferencialmente expresados para cada tratamiento, se realizó una representación de cada ruta en formato GML jerárquico, empleando un programa

de edición de gráficos GML (yEd) que permitió analizar cómo se propaga el factor de impacto en la ruta a partir de cada uno de los genes que se encuentran alterados y hacia aquellos que no lo están. Este tipo de gráficos nos permite evaluar la magnitud y la repercusión de cada uno de los cambios en la ruta, como consecuencia de la activación o la represión de los genes que la componen y su peso específico en la ruta. Cada gráfico GML muestra y representa los genes diferencialmente expresados con nodos elípticos y marcados en una gama de colores: rojo-naranja-amarillo-verde-azul en función de su estado sobre-expresado o reprimido y la magnitud del cambio descrito, encontrando nodos más oscuros cuando los cambios de expresión son más marcados, siendo el rojo y el azul oscuro los genes mas sobre-expresados y reprimidos de la ruta, respectivamente. A partir de cada nodo elíptico irradian flechas en el mismo color que la elipse, que indican hacia donde se dirige la perturbación causada por la alteración de ese gen, sabiendo por tanto a qué genes afectaría dicho cambio, que aparecen representados con nodos rectangulares y del mismo color que la perturbación de origen. Es interesante analizar en detalle qué genes son los que se ven alterados para contextualizar biológicamente esos cambios en los procesos patológicos que estamos estudiando.

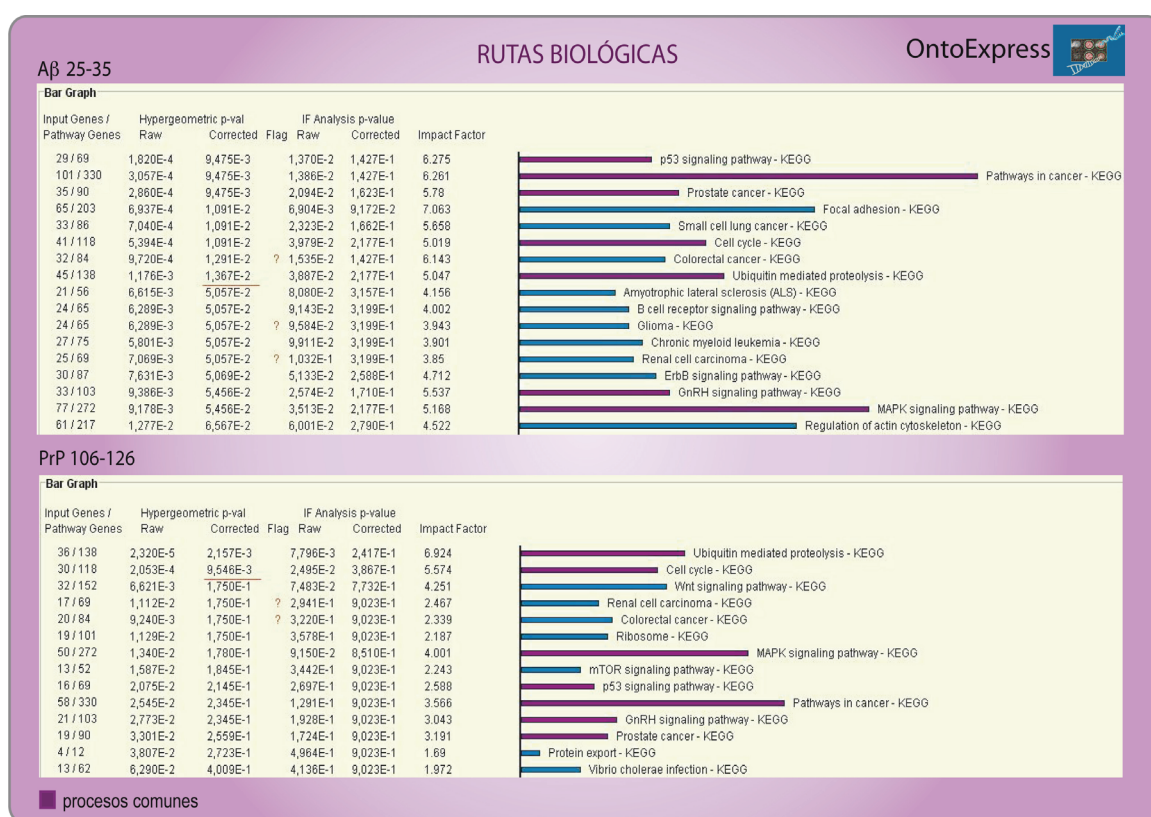


Figura 16. Rutas biológicas alteradas de forma significativa entre los genes regulados por el Aβ 25-35 y el PrP106-126. Cada diagrama de barras incluye los componentes celulares representados de forma significativa para ambos péptidos, ordenados de forma creciente en función del valor de significancia estadística. Cada uno de los procesos viene determinado por dos valores de probabilidad (*Hypergeometric p-value*): un p-valor para hipótesis simples (*Raw*) y un valor ajustado para test múltiples o FDR, calculado mediante una distribución hipergeométrica (*Corrected*). Se consideran significativos aquellos procesos con un p-valor <0,05 y/o FDR<0,05. De la misma forma para cada proceso se indica el número de genes regulados incluidos en cada una de las categorías respecto al número total de genes incluidos en la ruta (*Input genes/ Pathway Genes*), así como el factor de impacto (*Impact factor*) junto con la significancia estadística para dicho parámetro (*IF analysis p-value*), tanto para valores simples (*Raw*) como múltiples o FDR (*Corrected*), considerándose significativos aquellos con un p-valor <0,05 y/o FDR <0,05.

Tras realizar el análisis de las rutas para cada uno de los grupos experimentales, encontramos, al igual que para los análisis anteriores, rutas comunes para los genes expresados diferencialmente para el A β -Reg y el PrP-Reg (barras moradas). Entre estas rutas encontramos: la ruta de P53 (Fig 17 y 18 respectivamente), Ciclo celular (Fig 19 y 20), rutas implicada en procesos tumorales (Fig 21 y 22), cancer prostático (Fig 23 y 24), carcinoma celular renal (Fig 25 y 26), cancer colorrectal (Fig 27 y 28), proteólisis mediada por ubiquitina (Fig 29 y 30), la ruta de señalización de las gonadotropinas (Fig 31 y 32) y de las MAPquinasas (Fig 33 y 34). Además de encontrar rutas comunes, aparecen rutas enriquecidas exclusivamente en cada grupo de genes diferencialmente expresado para cada condición experimental. Para los genes A β -Reg encontramos alteradas las adhesiones focales (Fig 35), cáncer pulmonar de células pequeñas (Fig 36), esclerosis lateral amiotrófica (Fig 37), señalización mediada por receptores en células B (Fig 38), glioma (Fig 39), leucemia mieloide crónica (Fig 40), ruta de señalización mediada por Erb (Fig 41). Para los genes PrP-Reg encontramos la ruta de Wnt (Fig 42), el Ribosoma (Fig 43), ruta de señalización mediada por mTOR (Fig 44) y la ruta de exportación proteica (Fig 45). Todos los genes constituyentes de cada una de las rutas, junto con los genes diferencialmente expresados, el factor de perturbación para cada uno de los genes y los valores de significancia estadística quedan recogidos en los *Anexos II* (pestañas 7-27) y *III* (pestañas 7-13). Para poder contextualizar y concluir la dirección de todos estos cambios en cada una de las rutas alteradas, será necesario realizar un estudio exhaustivo de la función particular de cada gen dentro de dicha ruta y la consecuencia global de su sobre-expresión o represión.

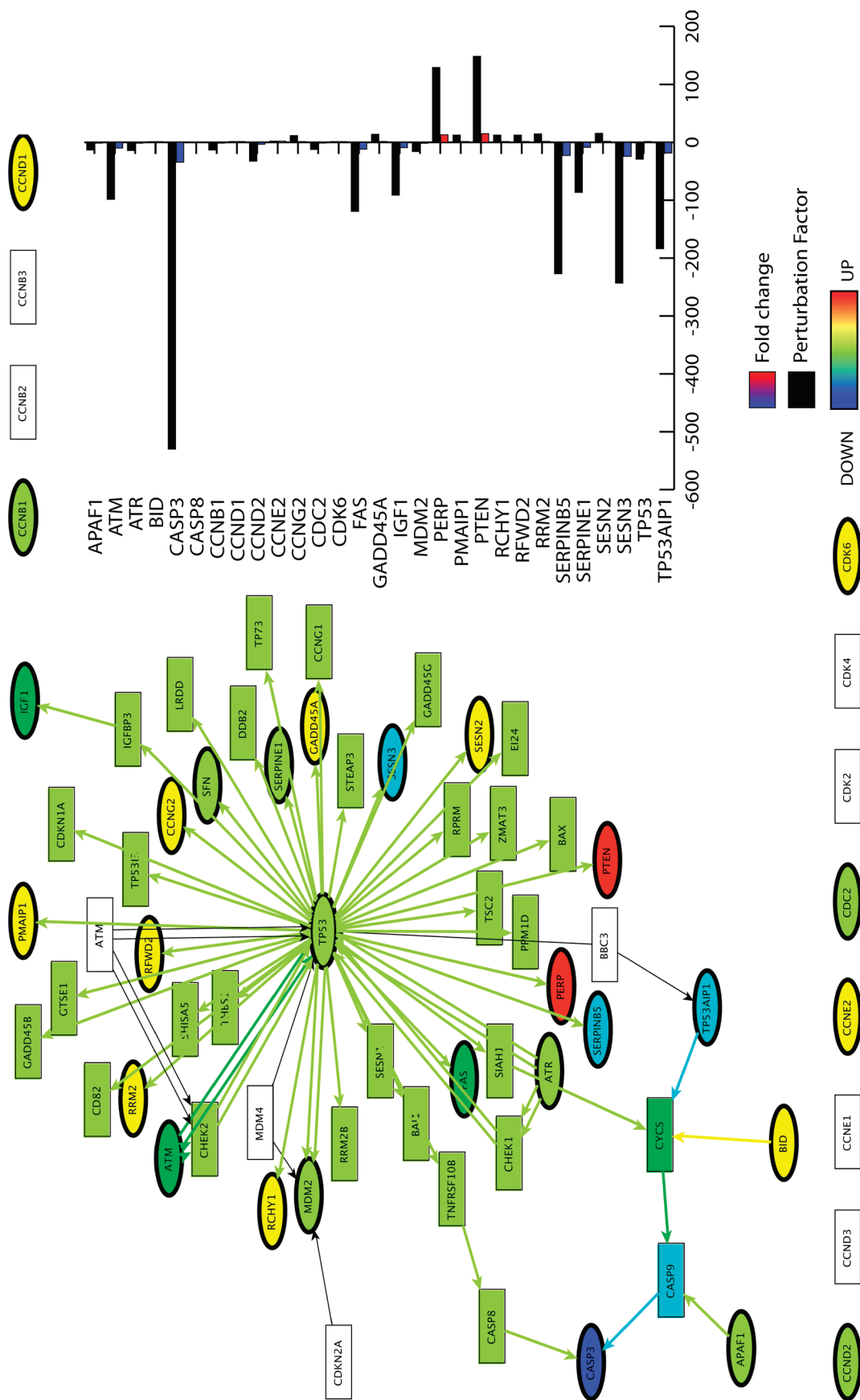


Figura 17. Ruta de P53 en células tratadas con A β 25-35.

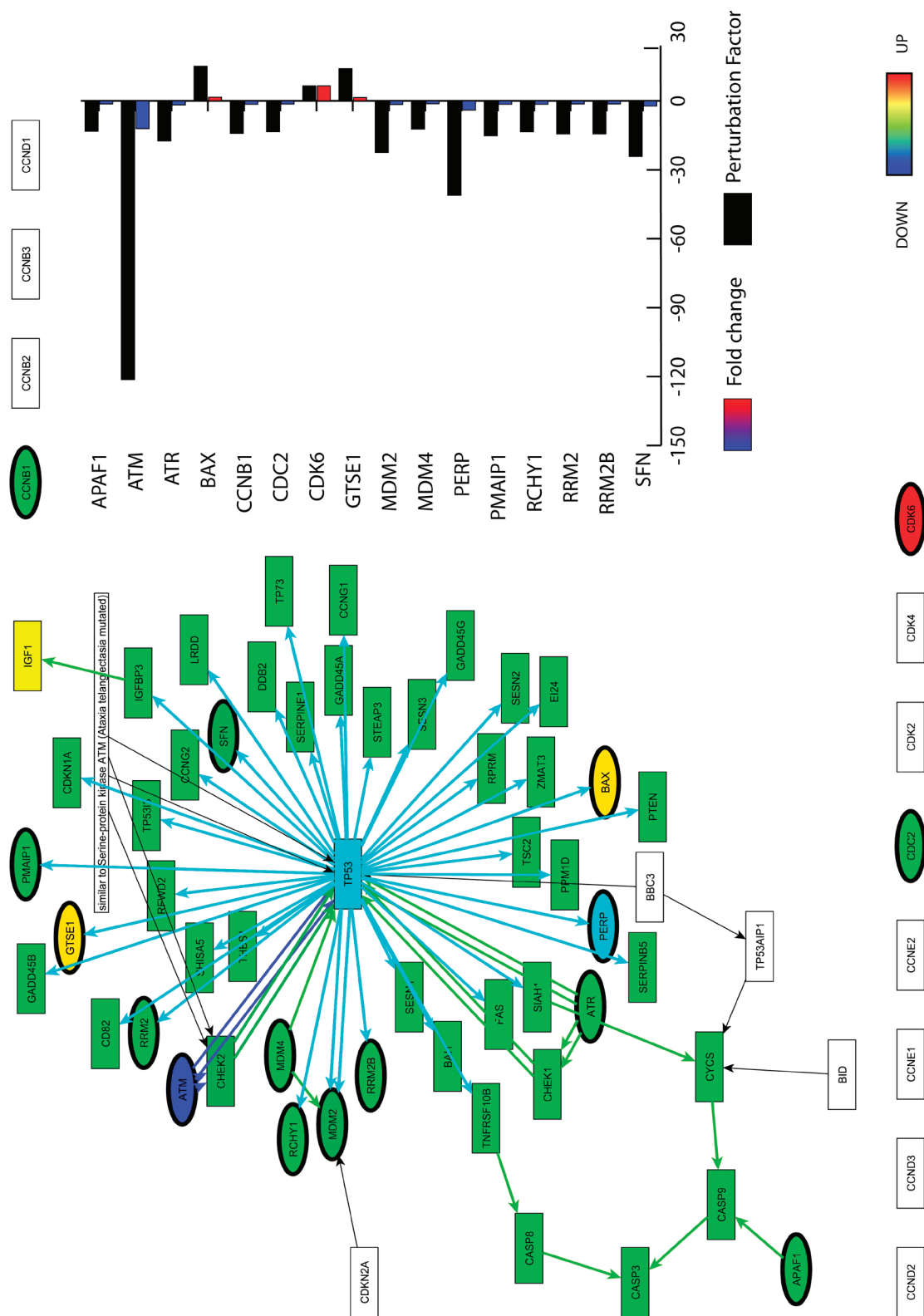


Figura 18. Ruta de P53 en células tratadas con PrP106-126

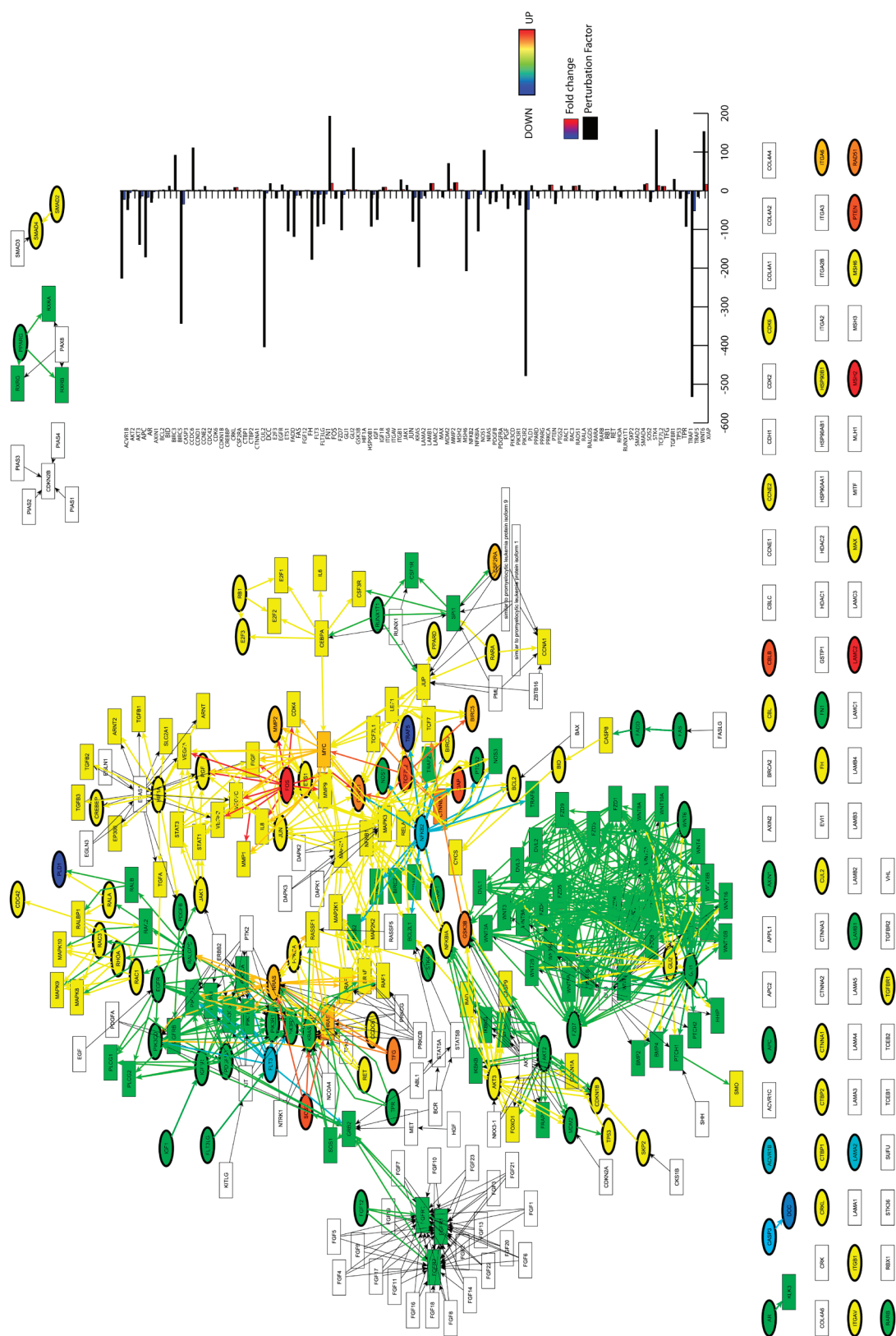


Figura 21. Ruta de procesos tumorales en células tratadas con Aβ 25-35

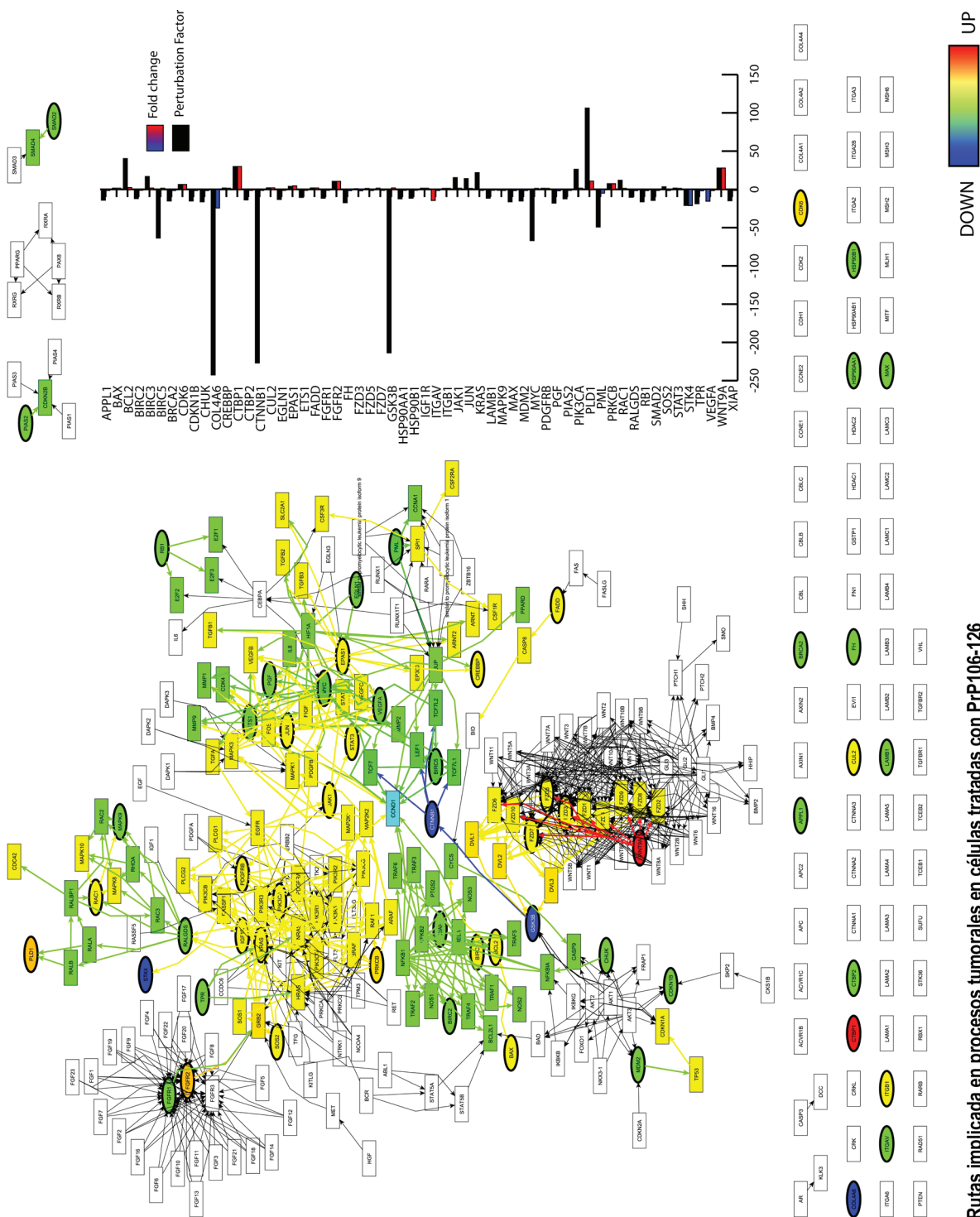


Figura 22. Rutas implicadas en procesos tumorales en células tratadas con PrP106-126

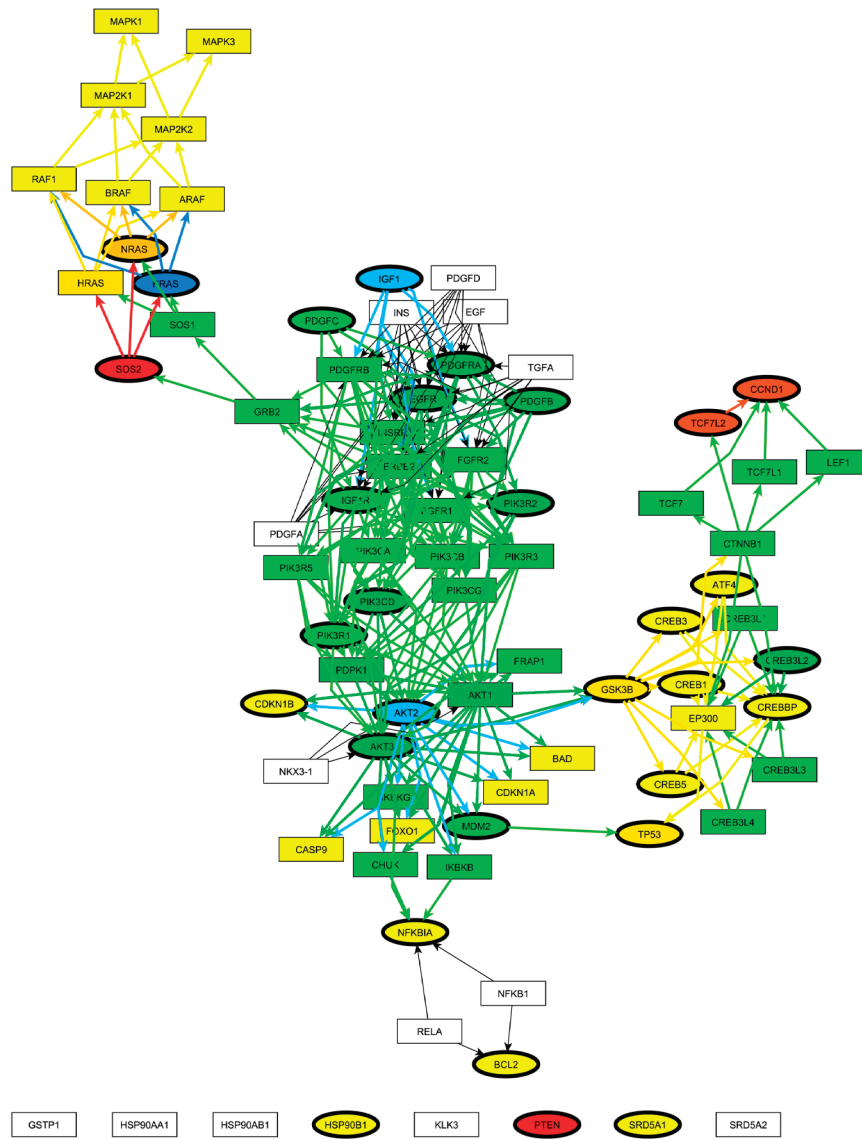
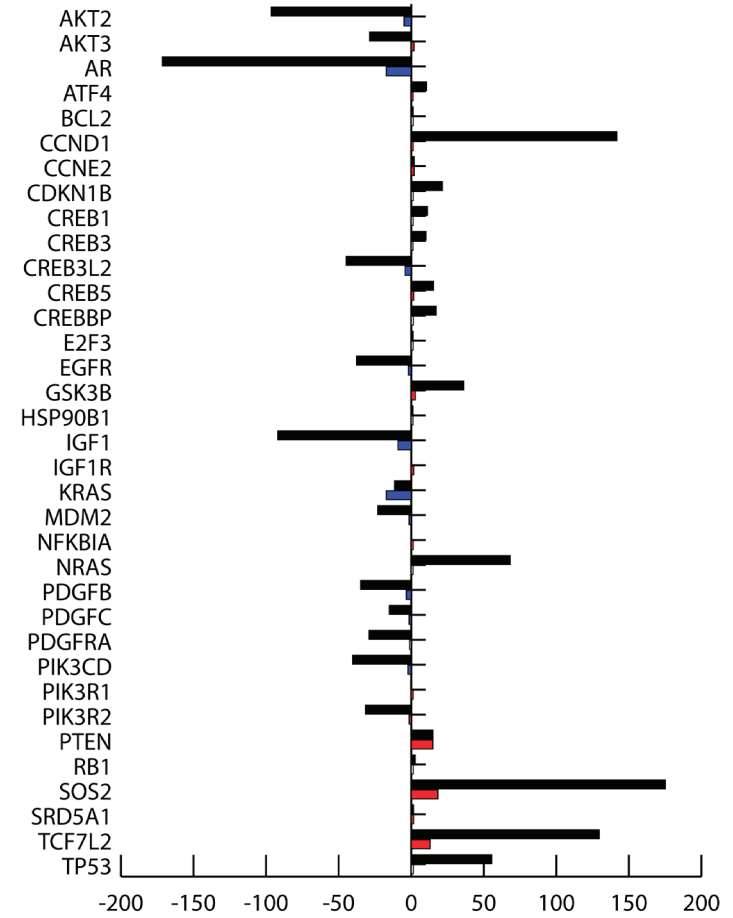
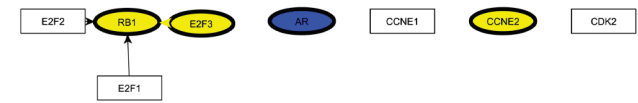


Figura 23. Ruta de cáncer prostático en células tratadas con A β 25-35



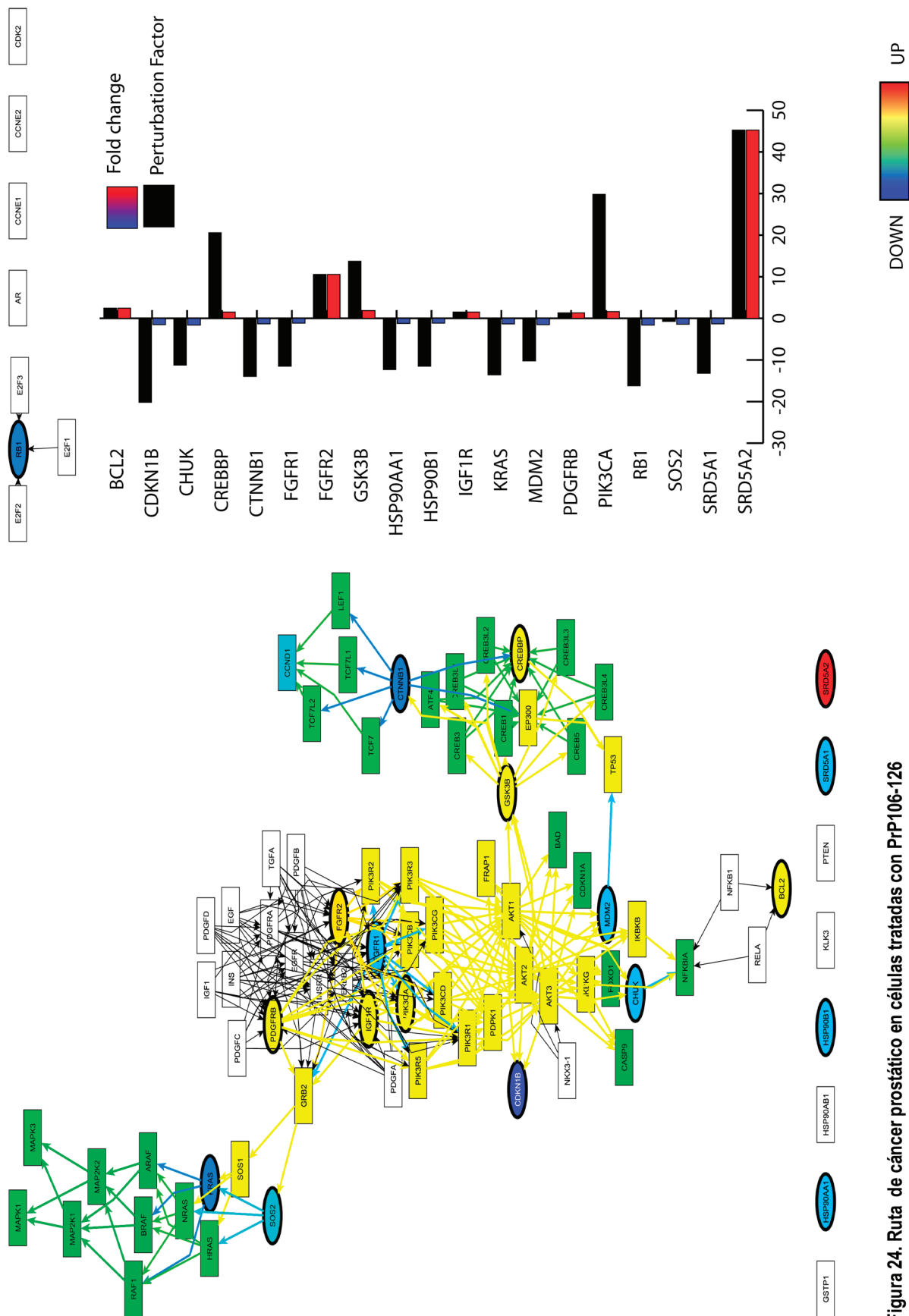


Figura 24. Ruta de cáncer prostático en células tratadas con PrP106-126

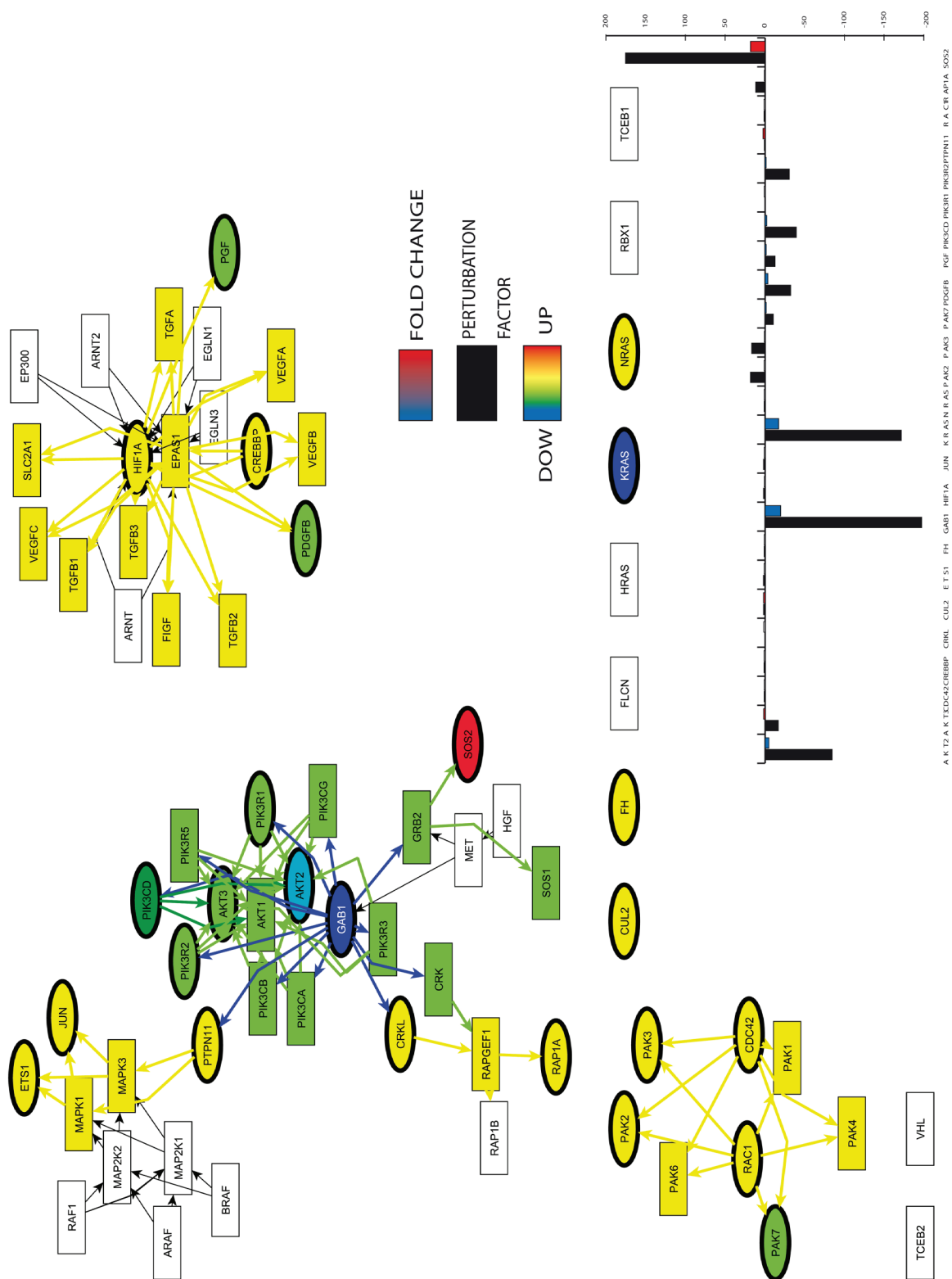


Figura 25. Ruta de carcinoma renal en células tratadas con A β 25-35.

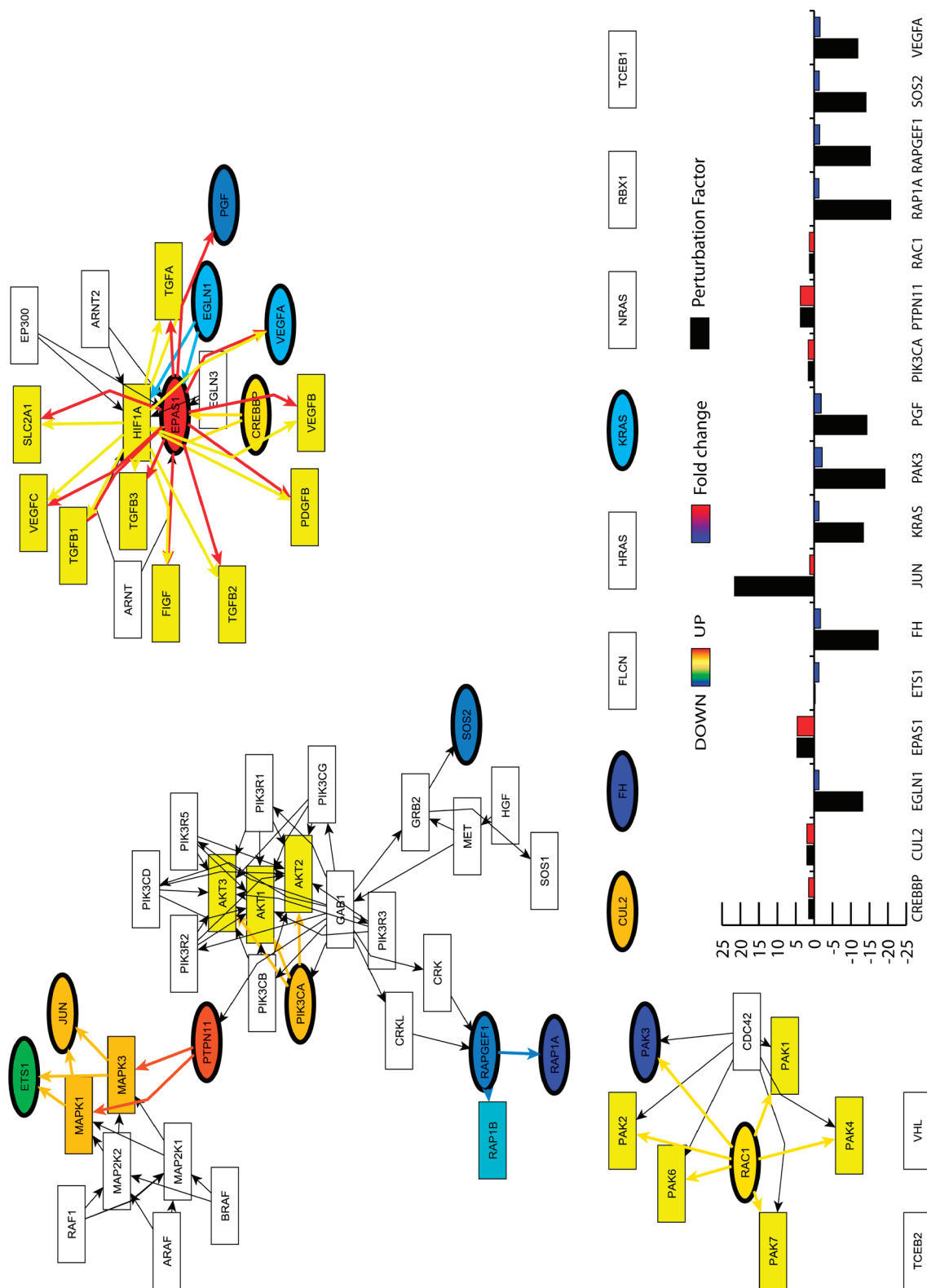


Figura 26. Ruta de carcinoma renal en células tratadas con PrP106-126

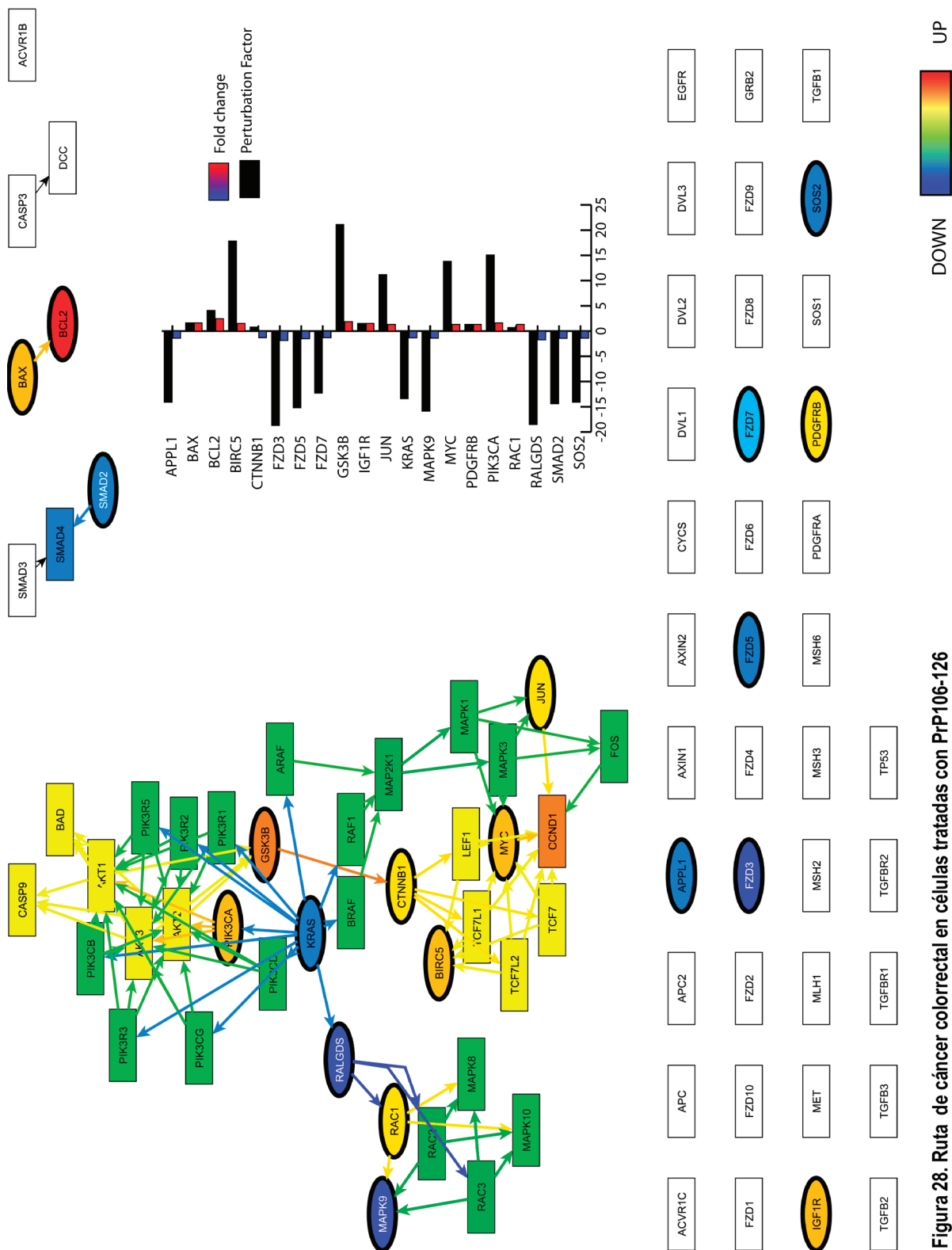


Figura 28. Ruta de cáncer colorrectal en células tratadas con PrP106-126

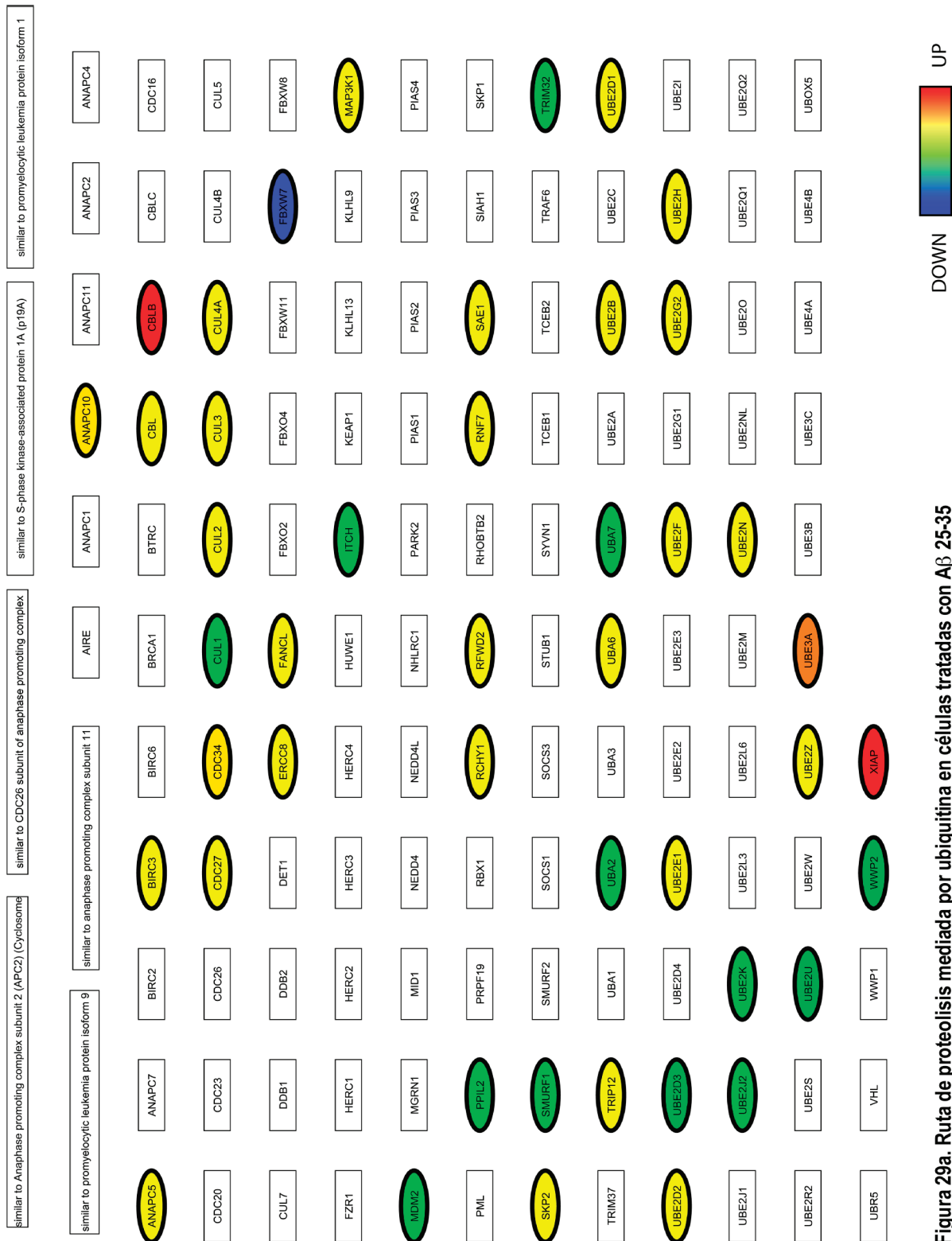


Figura 29a. Ruta de proteólisis mediada por ubiquitina en células tratadas con A β 25-35

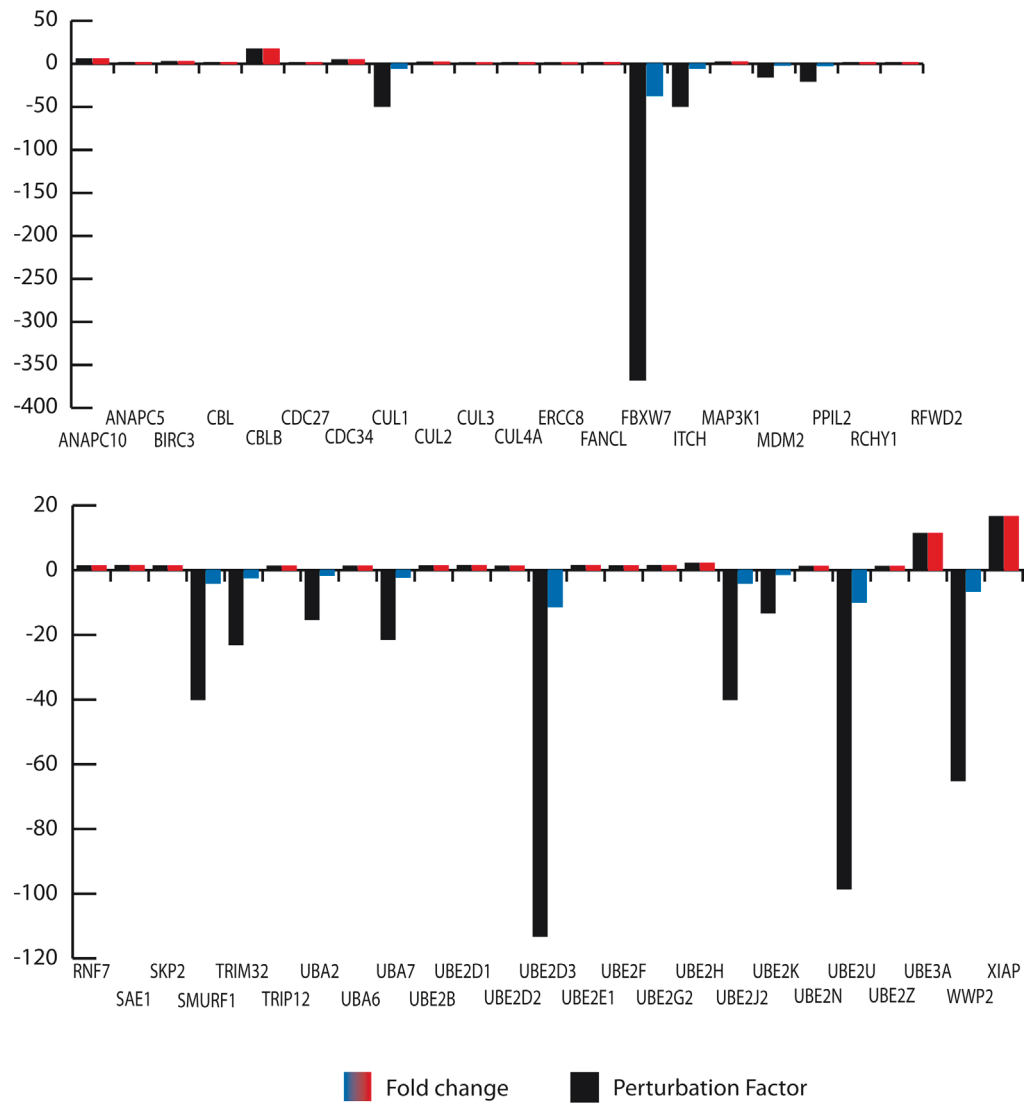
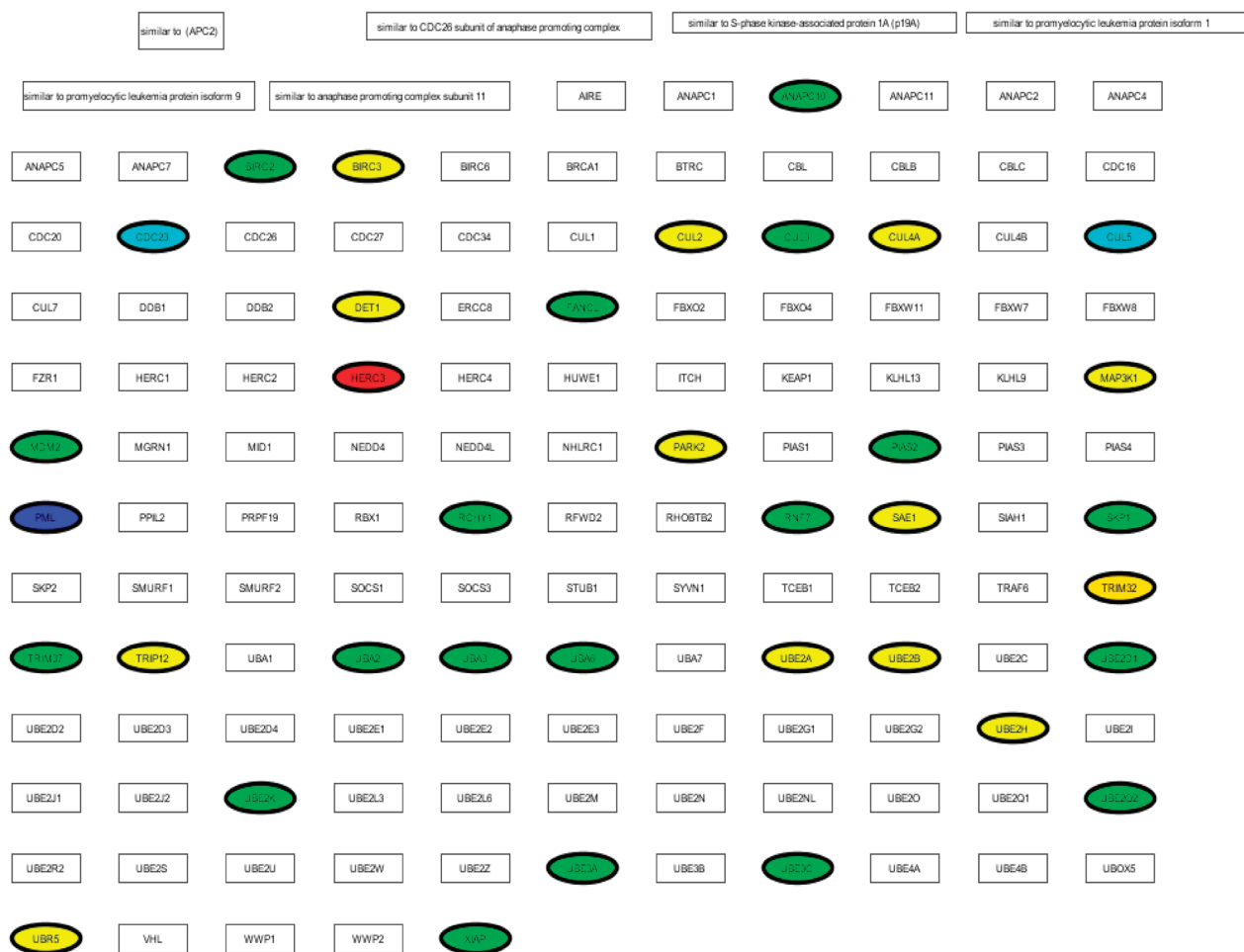


Figura 29b. Ruta de proteólisis mediada por ubiquitina en células tratadas con A β 25-35



DOWN UP

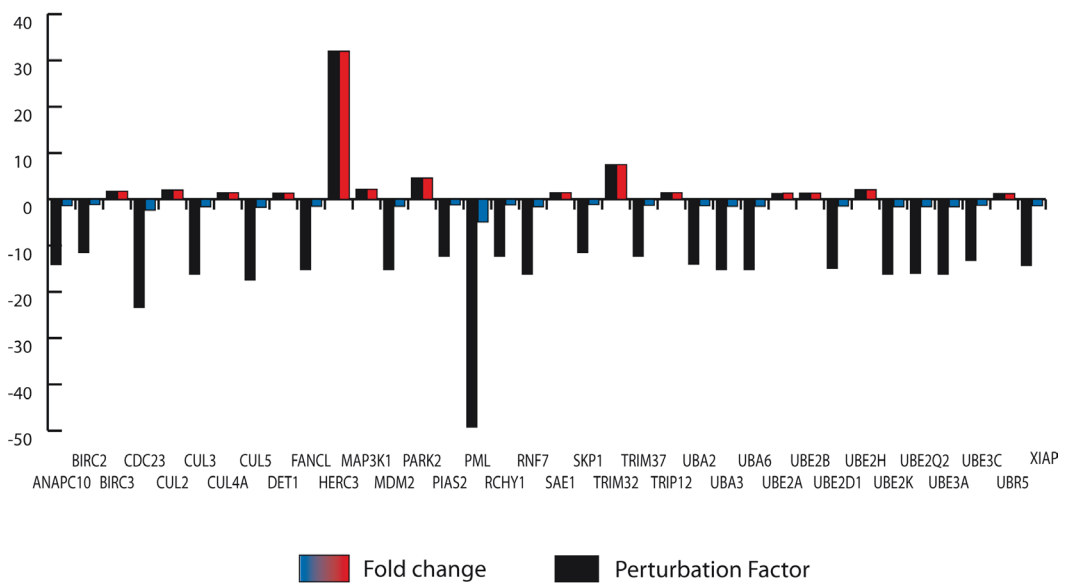


Figura 30 Ruta de proteólisis mediada por ubiquitina en células tratadas con PrP106-126

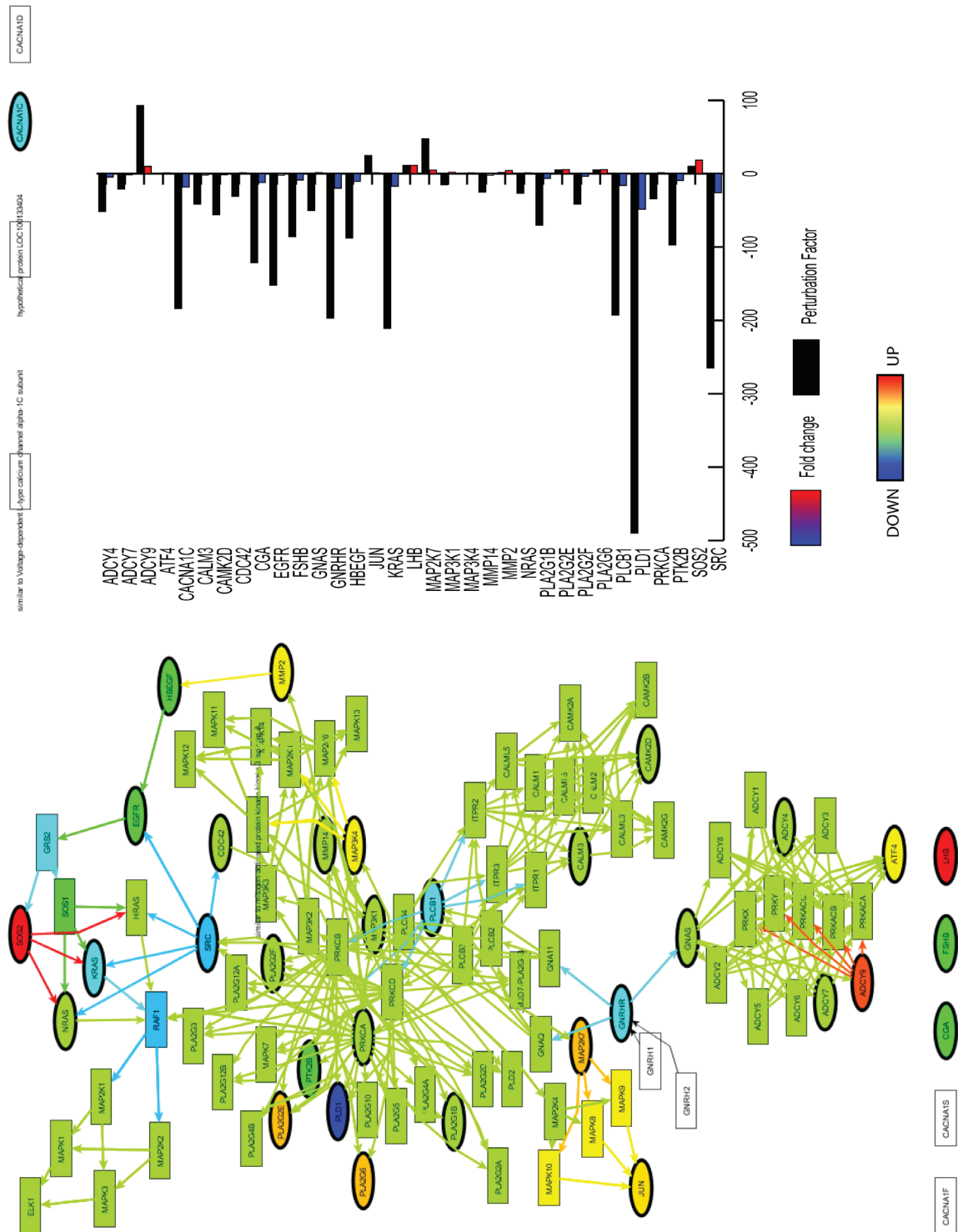


Figura 31. Ruta de señalización de las gonadotropinas en células tratadas con Aβ 25-35

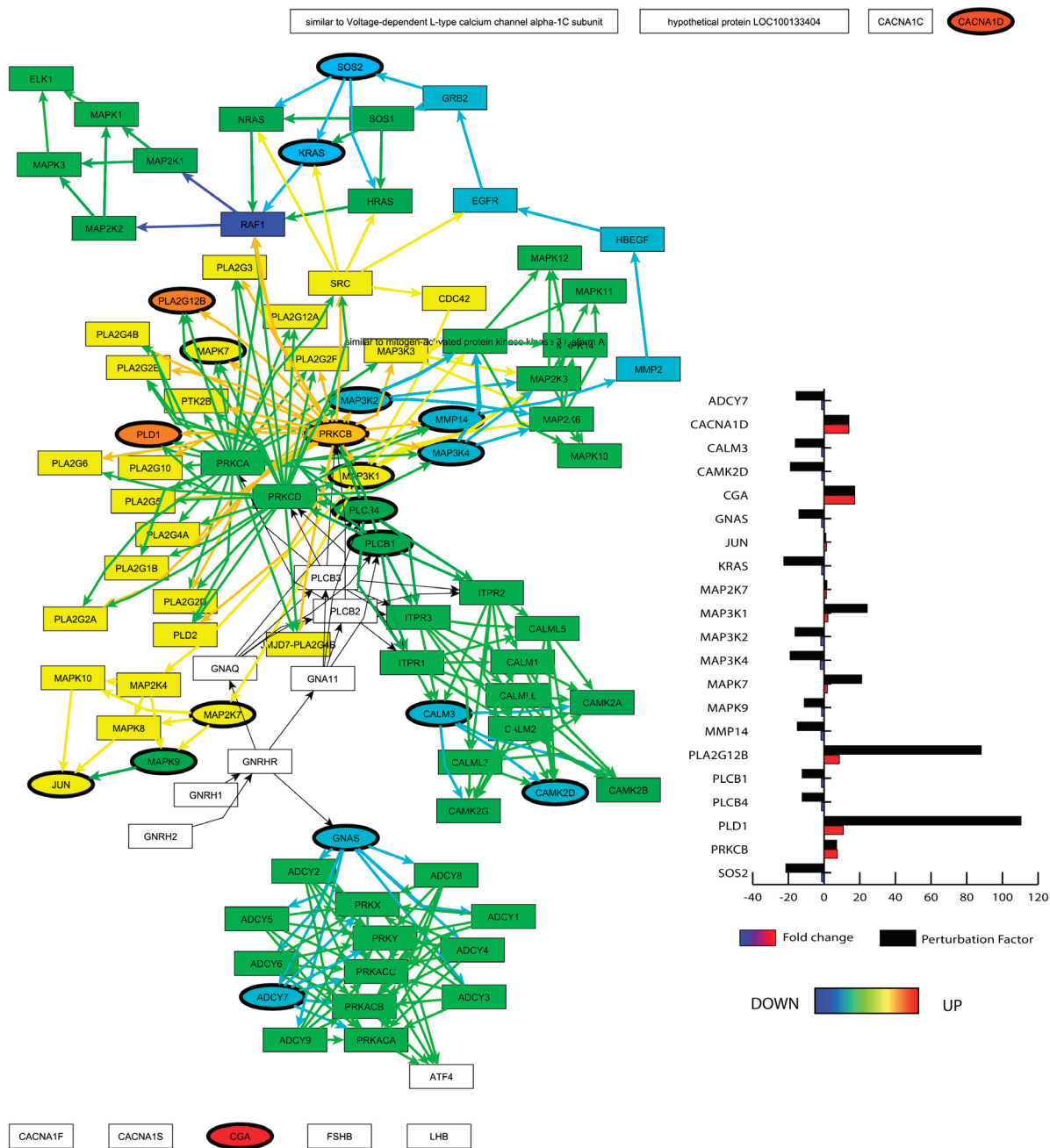


Figura 32. Ruta de señalización de las gonadotropinas en células tratadas con PrP106-126

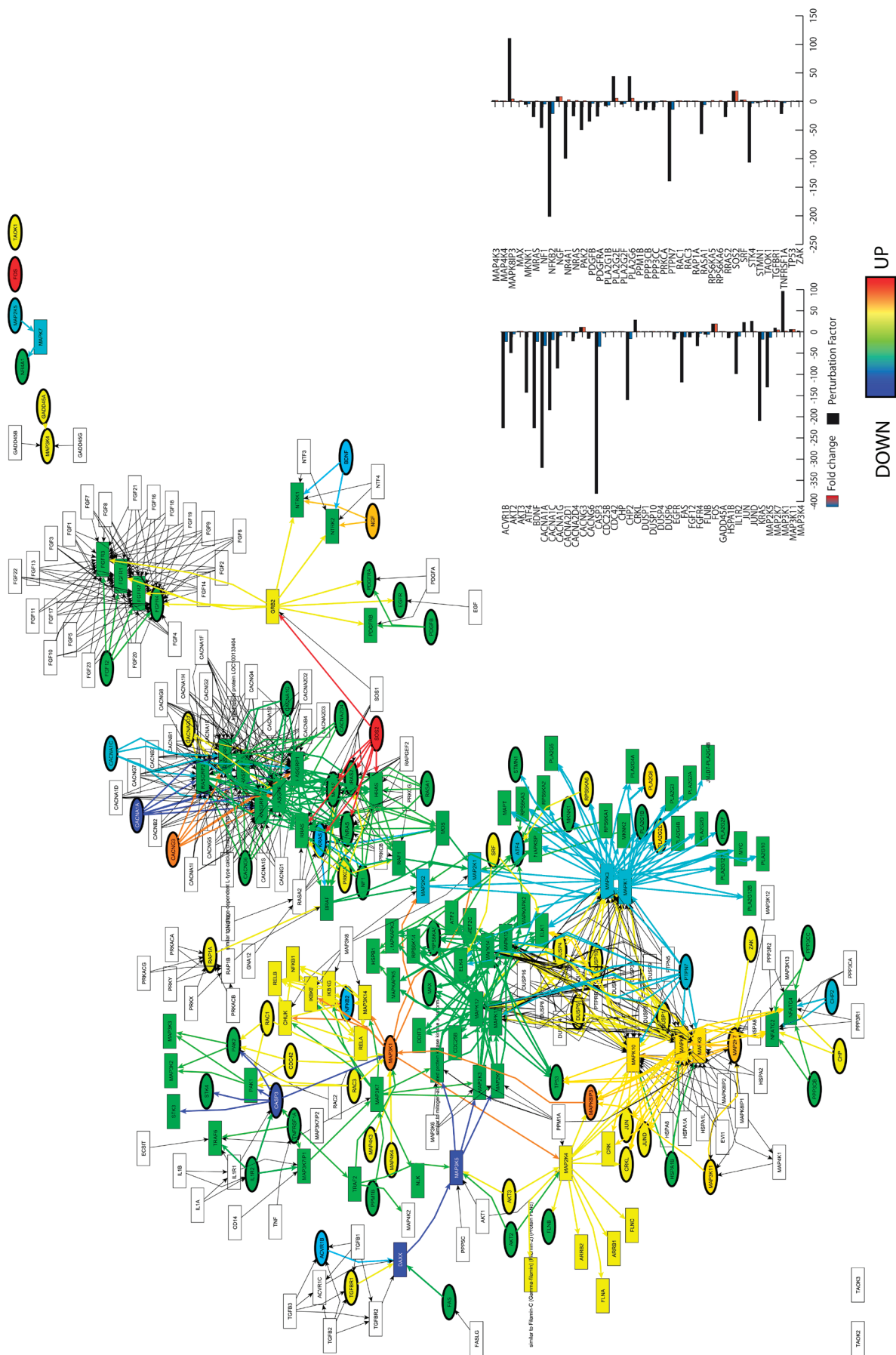


Figura 33. Ruta de las MAP quinasas en células tratadas con Ap 25-35

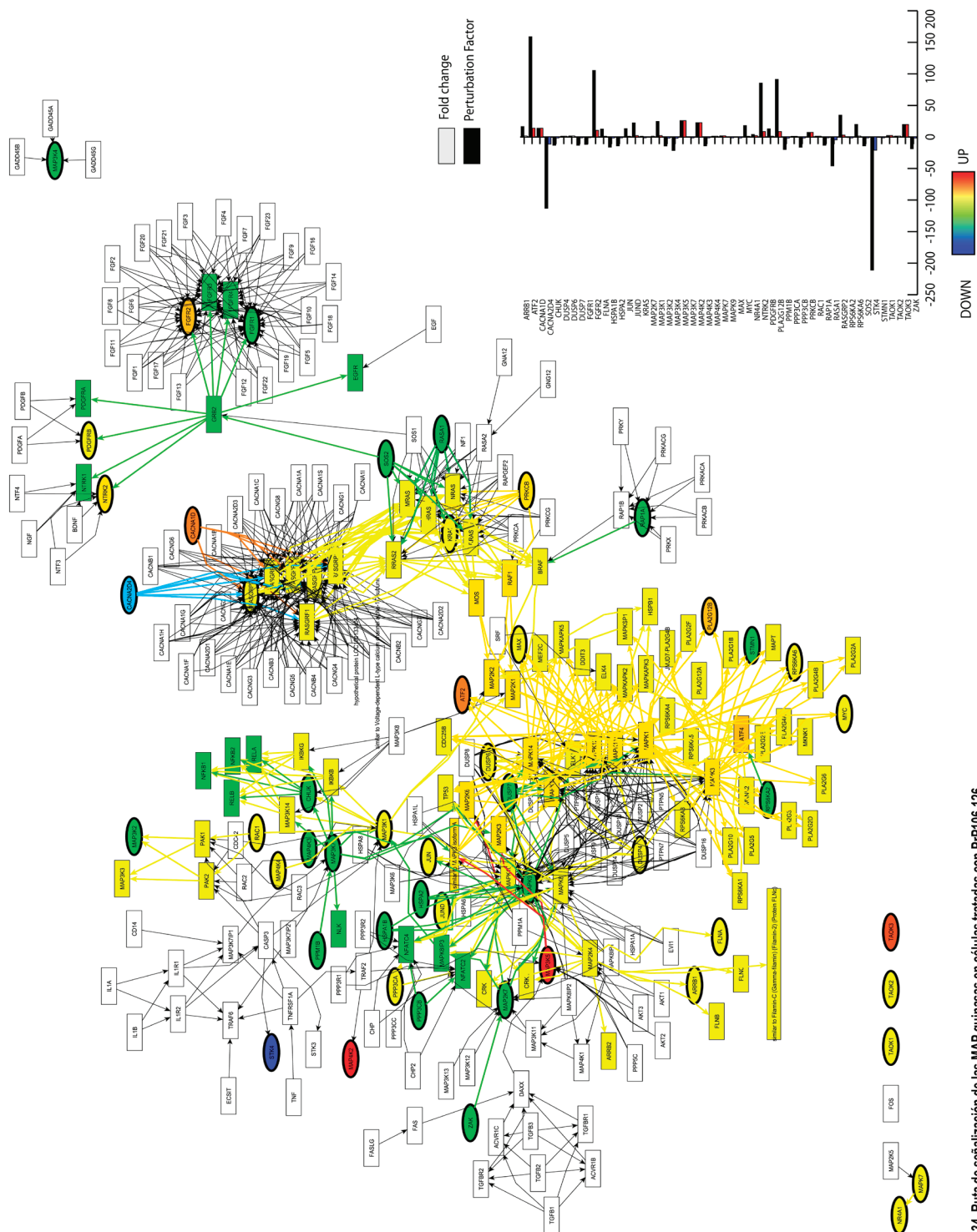


Figura 34. Ruta de señalización de las MAP quinasas en células tratadas con PrP106-126

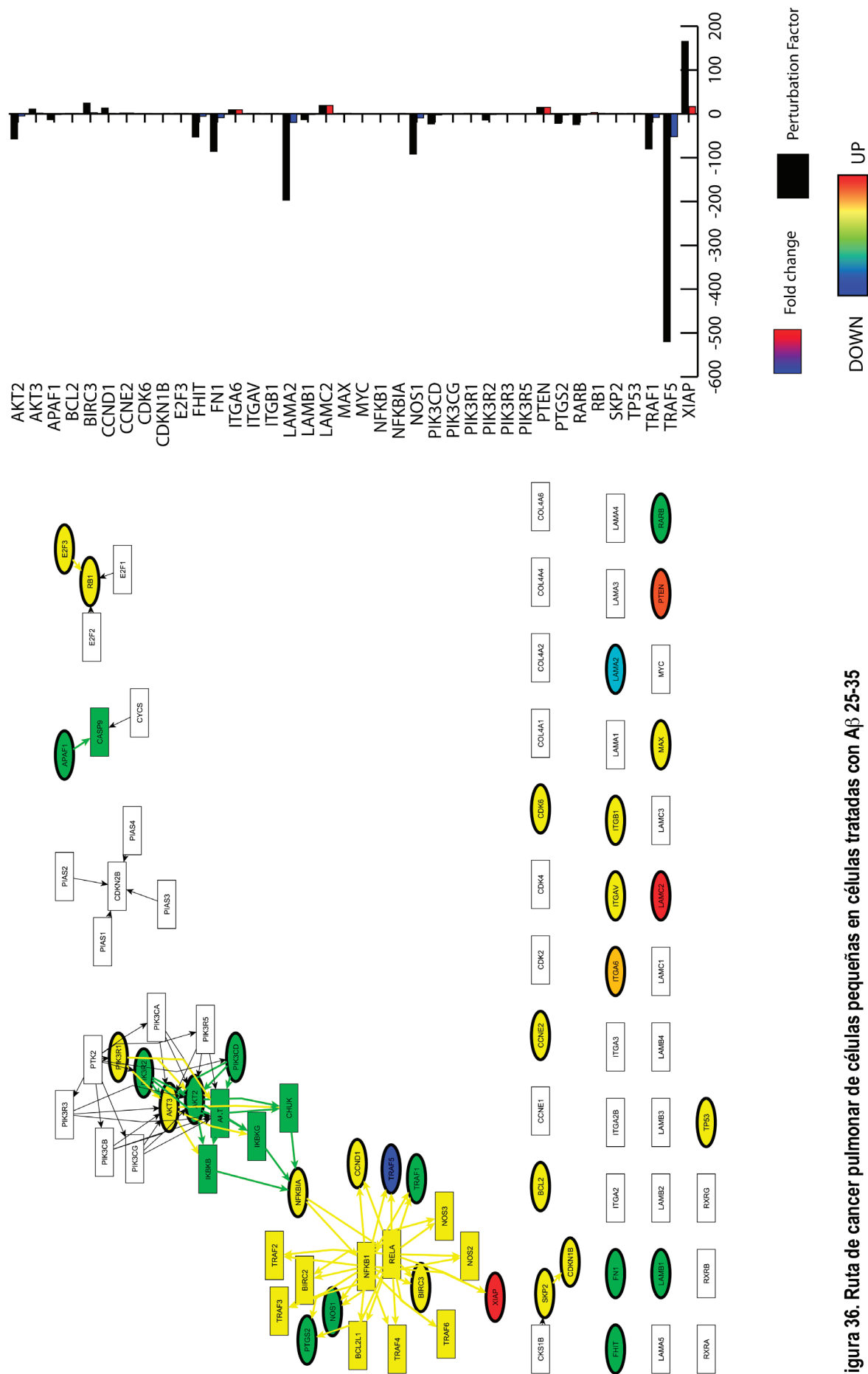


Figura 36. Ruta de cancer pulmonar de células pequeñas en células tratadas con A β 25-35

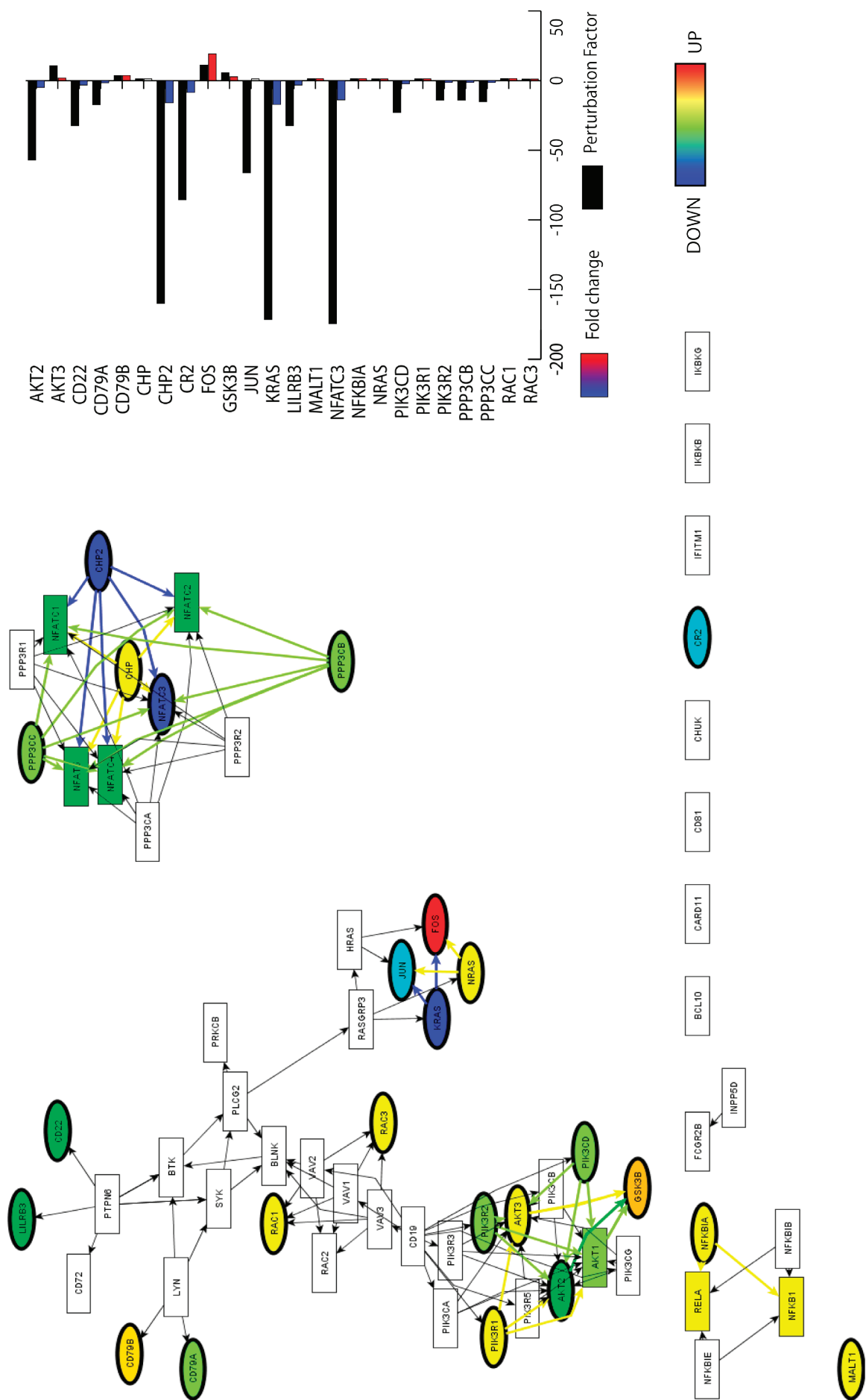


Figura 38. Ruta de señalización mediada por receptores en células B en células tratadas con Aβ 25-35

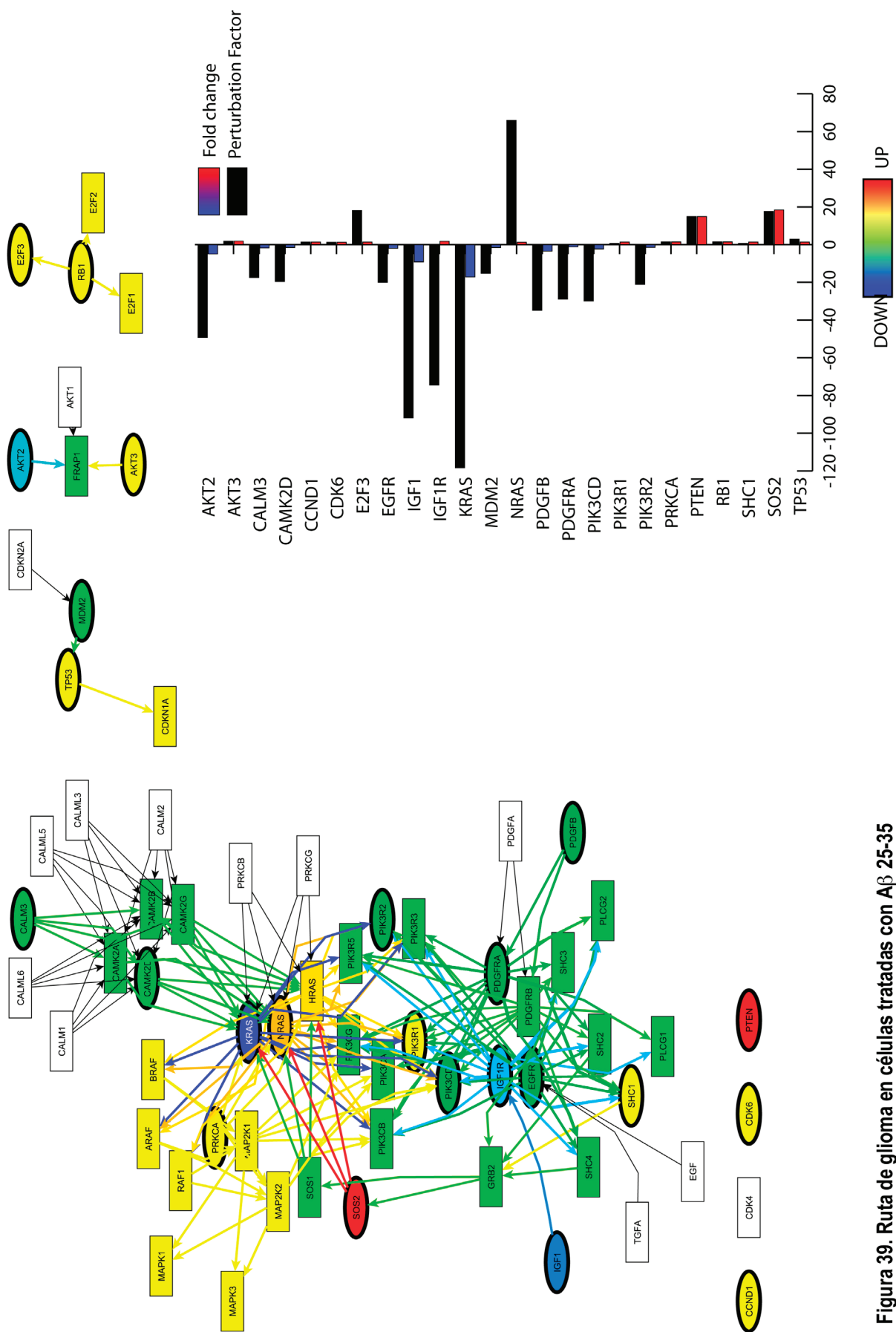


Figura 39. Ruta de glioma en células tratadas con Aβ 25-35

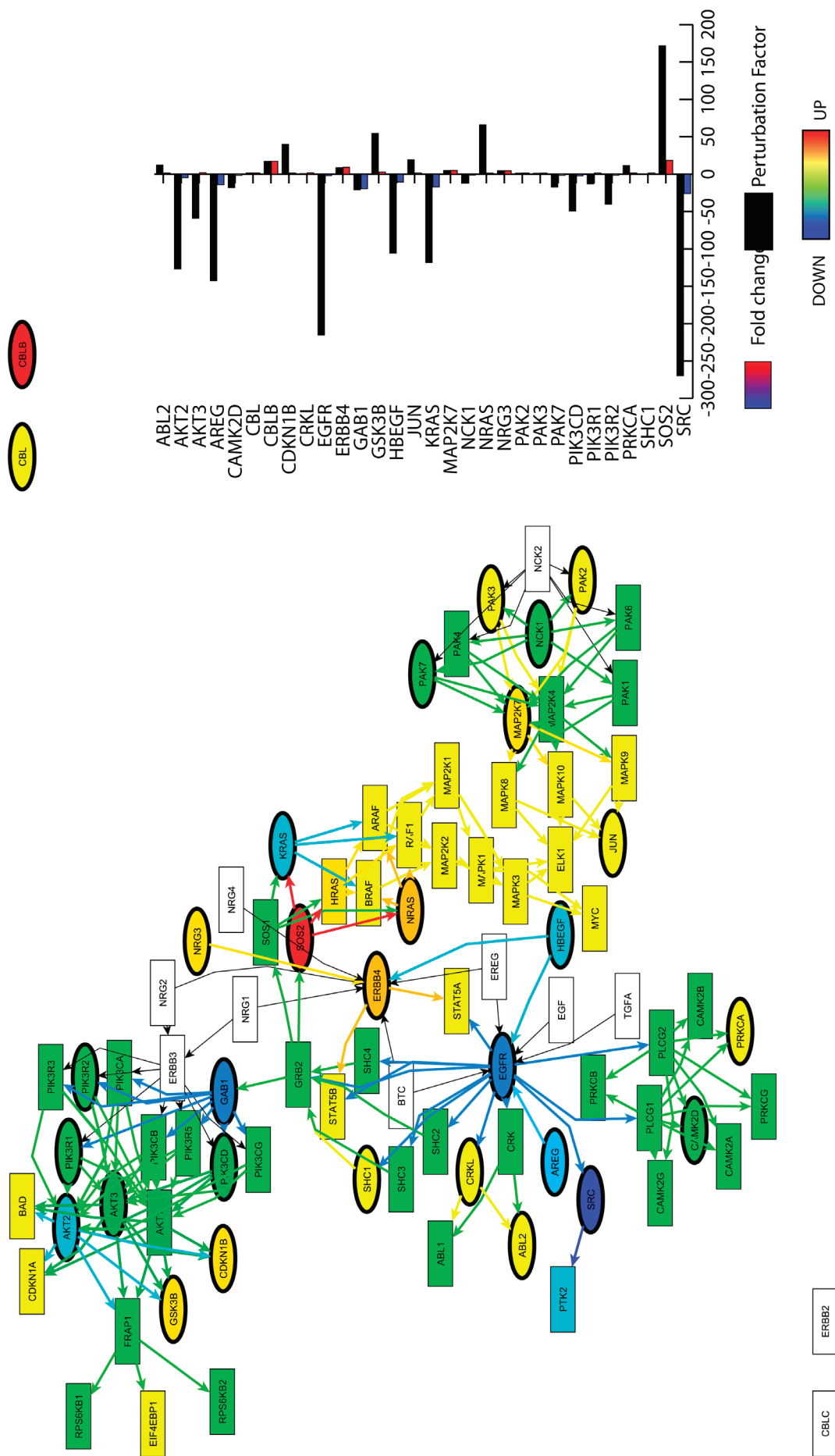


Figura 41. Ruta de señalización mediada por ErbB en células tratadas con Aβ 25-35

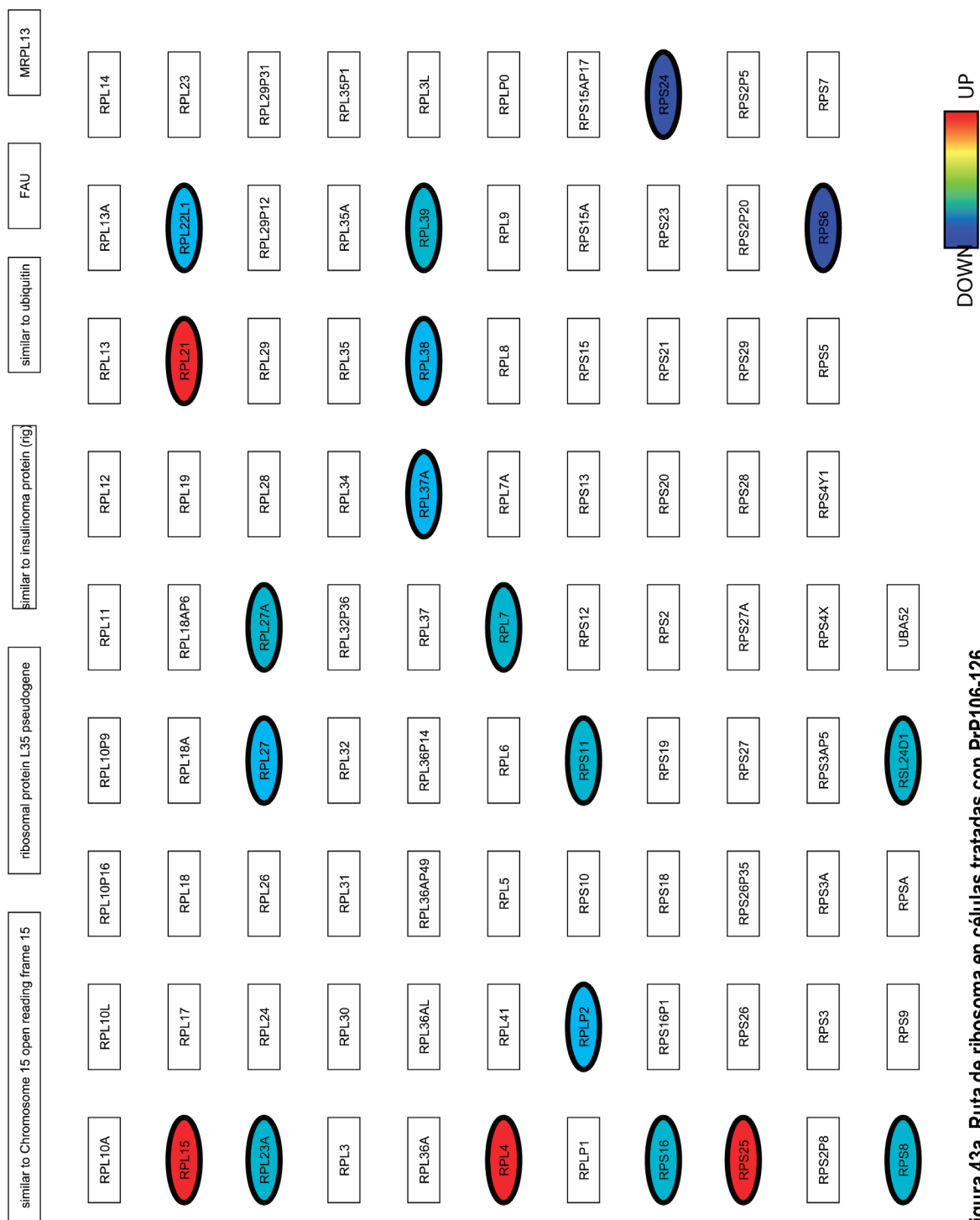


Figura 43a. Ruta de ribosoma en células tratadas con PrP106-126.

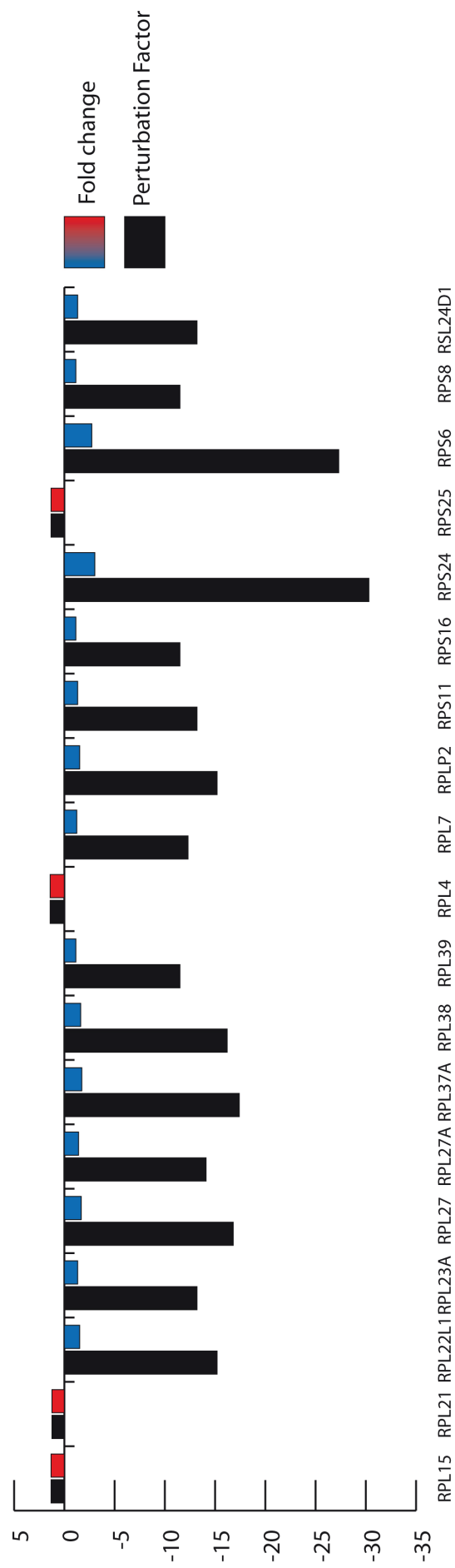


Figura 43b. Ruta de ribosoma en células tratadas con PrP106-126.

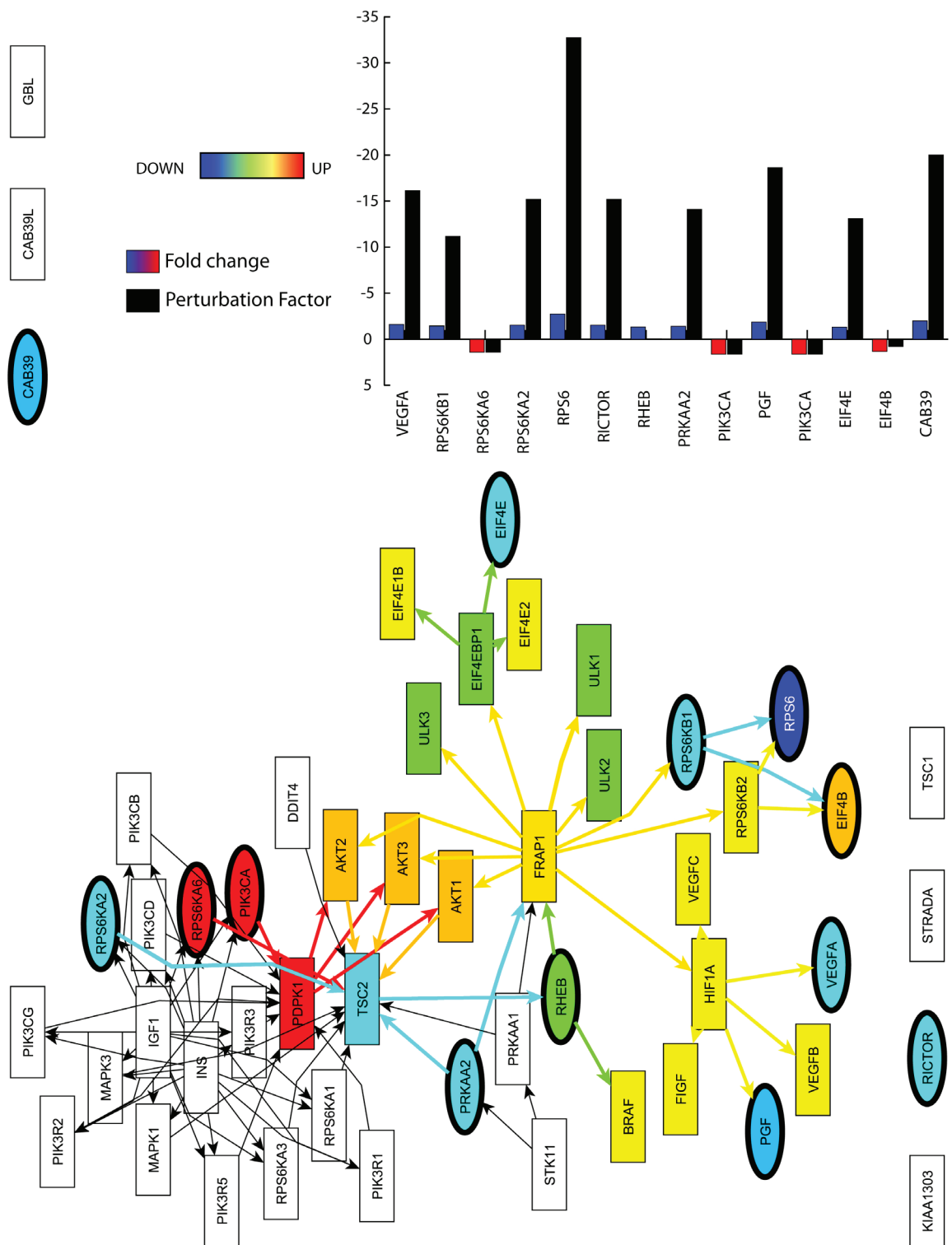


Figura 44. Ruta de señalización mediada por mTOR en células tratadas con PrP106-126

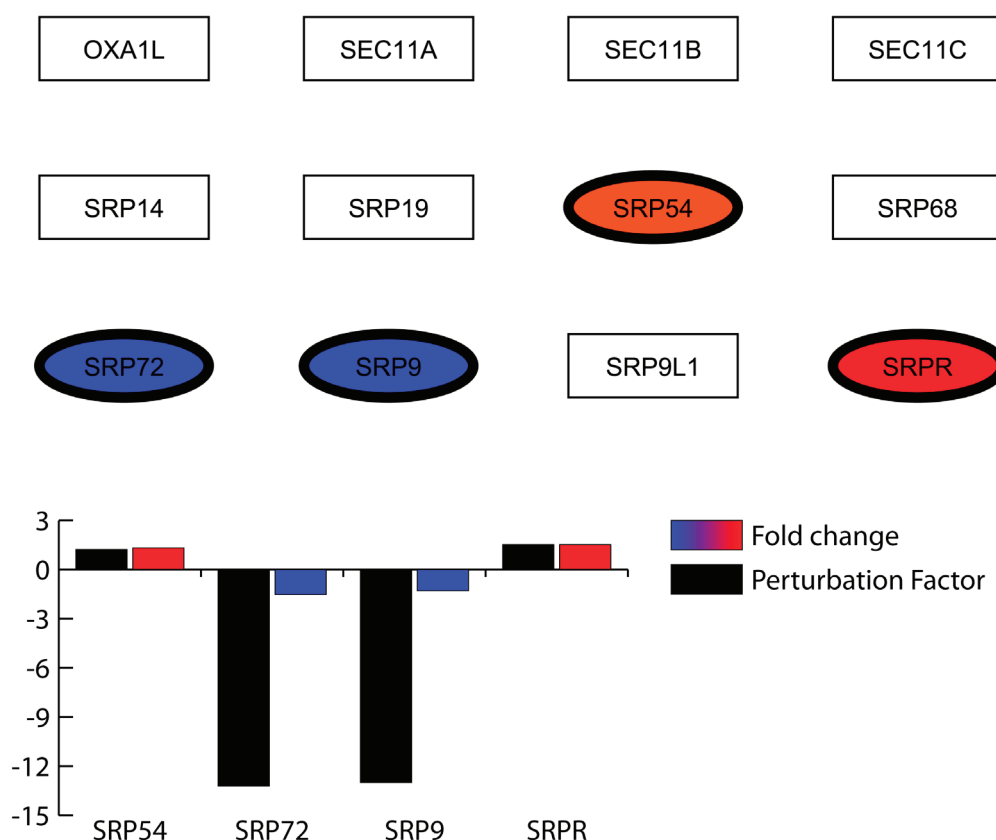


Figura 45. Ruta de exportación proteica en células tratadas con PrP106-126

Por último con el fin de determinar si existían cambios a nivel de regulación transcripcional en los genes diferencialmente expresados para cada uno de los grupos experimentales se estudió la posible alteración de sitios de unión putativos para distintos factores de transcripción, para ello empleamos la herramienta bioinformática FatiGO implementada en la interfaz Babelomics (Figura 46). Realizamos un estudio comparativo entre la lista de genes diferencialmente expresados (tanto sobre-expresados como reprimidos), y el total de genes recogidos en el *microarray* HU133 plus 2.0, con el fin de detectar una sobre- o sub-representación de sitios de unión para determinados factores de transcripción, como consecuencia de cualquiera de los dos tratamientos. Dentro de los genes A β -Reg encontramos una ligera sub-representación de sitios de unión para algunos factores de transcripción como LXR, PXR, CAR, COUP, RAR, Nkx2-5, Hand1:E47, ELK1, SF-1, mientras que para otros encontramos una clara y significativa sub-representación de determinados sitios de unión para algunos factores de transcripción en el grupo de genes diferencialmente expresados por efecto del A β . Es decir, existen menos sitios de unión para los factores que describimos a continuación respecto a los que se esperaba encontrar y se encuentran el total de genes anotados en el *microarray* empleado. Estos factores de transcripción son los siguientes: MEF-3 (8% de sitios de unión en los genes regulados por A β vs 91,94% encontrados en el total de genes anotados), c-ETS-1p54 (30,95% vs 69,05%), GABP (13,06% vs 86,94%), NRF-2 (20,31% vs 79,69%) y Nkx2-2 (30% vs 70%). Del mismo modo pero en sentido contrario existe una ligera sobre-representación de sitios de unión para Oct-1 entre los genes diferencialmente expresados por A β (Figura 46). En el caso de los genes PrP-reg encontramos una ligera subrepresentación para CDX (45% vs 54%) y HNF-1 (47% vs 53%) y una grandísima sobre-representación de sitios de unión para el factor de transcripción GR (98% vs 1,69%) (Figura 46).

A β 25-35

Significant terms				
Index	Term	#1 vs #2	p value	Adjusted p value
<i>sort_up</i>				
Transcription Factors				
0	LXR, PXR, CAR, COUP, RAR	45.21% 54.79%	4.77e-7	1.22e-4
0	MEF-3	8.06% 91.94%	7.24e-6	6.16e-4
0	Nkx2-5	45.81% 54.19%	5.25e-6	6.16e-4
0	c-Ets-1p54	30.95% 69.05%	3.27e-5	2.08e-3
0	GABP	13.06% 86.94%	3.39e-4	1.44e-2
0	NRF-2	20.31% 79.69%	3.33e-4	1.44e-2
0	Hand1:E47	40.99% 59.01%	4.42e-4	1.5e-2
0	Oct-1	53.51% 46.49%	4.69e-4	1.5e-2
0	Nkx2-2	30.33% 69.67%	1.26e-3	3.57e-2
0	Elk-1	40.75% 59.25%	1.76e-3	4.11e-2
0	SF-1	42.2% 57.8%	1.77e-3	4.11e-2

PrP 106-126

Summary of significant terms						
Index	Term	Percentage with term	#1 vs #2	Genes	p value	Adjusted p value
<i>sort_up</i>						
Transcription Factors						
1	CDX	77.92% 91.63%	45.96% 54.04%	#1: 218174_s_at ... #2: 1552619_a_at...	8.34e-7	2.07e-4
1	GR	50% 0.86%	98.31% 1.69%	#1: 220388_at 15... #2: 230560_at 20...	1.77e-5	4.38e-3
1	HNF-1	88.96% 96.72%	47.91% 52.09%	#1: 243508_at 15... #2: 224676_at 21...	4.97e-5	6.16e-3

Figura 46. Sitios de unión putativos para factores de transcripción. Los diagramas de barras representan una sub-/sobrerrepresentación de determinados sitios de unión para factores de transcripción en las listas de genes regulados significativamente por el efecto del A β 25-35 y PrP106-126. Son significativos $0,05 < P\text{-value}$ y *Adjusted P-value*.

4.2.2.3. Clustering jerárquico: Análisis detallado de los distintos subclusters mediante herramientas de Ontología Génica (OntoExpress y PathwayExpress).

En base a los perfiles de expresión génica característicos de cada tratamiento, se trató de establecer grupos que presentaran una regulación similar; para ello y partiendo de los datos de expresión correspondientes a aquellos genes que presentaban un perfil de expresión diferencial para cada tratamiento, se realizó un análisis de *clustering* jerárquico no supervisado aglomerativo utilizando como medida de similitud entre los vectores de expresión génica la correlación cuadrática de Pearson, con el fin de observar tendencias en el comportamiento de los genes agrupados. Como método de ligamiento para la construcción de los dendrogramas, se utilizó el método de ligamiento promedio por el cual se selecciona la distancia promedio entre las agrupaciones o *clusters*.

Obtenidos los *clusters* correspondientes a los perfiles de expresión génica asociados tanto al A β 25-35 como al PrP106-126, se puede observar primero cómo éstos se organizan en dos grandes ramas en función de aquellos genes sobre-expresados y reprimidos respecto al control y segundo cómo están constituidos por pequeños agrupamientos numerados: S1-S38 en el caso del A β 25-35 (Figura 47) y S1-S44 en el caso del PrP106-126 (Figura 48). Estos pequeños agrupamientos reúnen aquellos genes que presentan niveles de expresión con tendencias equivalentes, de forma que genes que presentan comportamientos equivalentes podrían estar coregulados y/o implicados en las mismas funciones biológicas, procesos moleculares o rutas de transducción de señal. Estos pequeños agrupamientos se encuentran a su vez englobados en grupos de mayor tamaño SCA-SCG en el caso del A β 25-35 y SCA-SCJ en el caso del PrP106-126, de forma que aquellos que son más parecidos entre sí, se encuentran más próximos. Tanto los genes sobreexpresados, como los reprimidos y los agrupamientos de mayor tamaño se integraron con anotaciones funcionales y moleculares empleando distintas herramientas de ontología génica, con el fin de determinar si las alteraciones en la expresión génica se manifiestan en alteraciones a nivel de procesos biológicos, funciones moleculares o rutas de transducción de señal.

Una vez se realizó el análisis de ontología génica para todos y cada uno de los grupos de genes regulados, tanto sobre-expresados como reprimidos por el A β 25-35 y por el PrP106-126, se llevó a cabo un estudio más minucioso, de forma que las pequeñas agrupaciones obtenidas de los *clusters* jerárquicos y que se corresponden con aquellos genes que presentan una tendencia equivalente en su comportamiento fueron integradas con distintas anotaciones funcionales y moleculares. Para ello y partiendo de los *clusters* obtenidos para cada perfil de expresión génica se tomaron las agrupaciones de mayor tamaño o *subclusters* y una a una se fueron integrando con anotaciones funcionales, moleculares así como con rutas de transducción de señal, tratando de determinar si dentro de esos grupos de genes con comportamientos similares y que podrían estar coregulados, existiera alguna función biológica, algún proceso molecular o alguna ruta de transducción de señal representada de forma significativa, aportándonos por tanto información acerca de qué procesos podrían verse alterados por el efecto neurotóxico tanto del A β 25-35 como del PrP106-126. Para llevar a cabo este estudio, se utilizaron de nuevo las herramientas informáticas *OntoExpress*TM y *PathwayExpress*TM.

Si inicialmente estudiamos el *cluster* generado a partir de los datos de expresión obtenidos tras la realización del tratamiento con el A β 25-35, vemos que éste consta de siete pequeñas agrupaciones o *subclusters* numerados SCA-SCG (Figura 47).

El *subcluster* A (SCA) está constituido a su vez por ocho agrupamientos (s1-s8) y presenta numerosas funciones moleculares y biológicas sobrerrepresentadas de forma significativa entre los genes agrupados.

Entre las distintas funciones moleculares un 3,55% de los genes presentan actividad transportadora de electrones, un 4,06% presenta actividad oxidorreductasa y un 1,52% presenta actividad como reguladores de la transcripción. De la misma forma en este grupo encontramos genes que presentan capacidad de unión a diversos metales, así un 3,05% de los genes presenta capacidad de unión a Mg^{2+} , un 2,54% de unión a Ca^{2+} y un 1,52% a Fe^{3+} . Por otro lado, entre los distintos procesos biológicos representados de forma significativa encontramos genes implicados en la neurogénesis (4,57%), en procesos de señalización mediante cascadas intracelulares (4,06%), en procesos de señalización célula-célula (2,54%) así como en procesos de diferenciación celular en la percepción visual (2,03%), en el transporte de electrones (3,55%), en desarrollo (3,55%), en el metabolismo (3,05%), en el transporte de proteínas (2,54%) y en la regulación de la transcripción dependiente de ADN (9,04%)

Entre las rutas biológicas representadas de forma significativa ($FDR < 0,05$) dentro del *subcluster* A encontramos la proteólisis mediada por ubiquitina, la ruta de señalización de Notch y la interacción de ligandos neuroactivos con receptores.

El *subcluster* B (SCB) también está constituido por ocho pequeños agrupamientos (s9-s16), entre los que se encuentran algunas funciones biológicas representadas de forma significativa ($FDR < 0,05$).

Entre los distintos procesos biológicos representados encontramos genes que codifican proteínas implicadas en procesos de transporte intracelular (2,75%), genes implicados en uniones homofílicas célula-célula (1,37%), así como genes implicados en el desarrollo esquelético (1,37%). En este cluster sin embargo no se encontraron ni funciones moleculares ni rutas de transducción representadas de forma significativa.

El *subcluster* C (SCC) está constituido por tres agrupamientos (s17-s20), entre los que encontramos varios genes que no pueden ser agrupados en una determinada categoría ontológica ya que se desconoce su función tanto molecular como biológica, de forma que sólo un 3,05% de ellos pueden englobarse en un proceso biológico concreto como es la regulación de la transcripción desde el promotor de la ARN polimerasa II. En contraposición, existen numerosas rutas de transducción de señal representadas de forma significativa ($FDR < 0,05$) entre los genes aquí agrupados. Así genes implicados en la ruta de Wnt, implicados en el sistema de adhesión focal y uniones adherentes, en el sistema de señalización mediado por el fosfatidil inositol y por los receptores *toll-like*, en la ruta de señalización del calcio y de las MAPquinasas.

Por su lado el *subcluster* D está formado por ocho agrupamientos (s21-s28), entre los que encontramos procesos moleculares y funciones biológicas representados de forma significativa ($FDR < 0,05$) y sin embargo no existe ninguna ruta de transducción de señal. Dentro de las funciones moleculares representadas encontramos que un 4,76% de los genes agrupados presentan capacidad de unión a proteínas mal plegadas y un 6,35% presentan capacidad oxidorreductasa. Por otro lado, dentro de los procesos biológicos encontramos cómo un 6,35% de los genes están implicados en procesos de plegamiento de proteínas y un 4,76% lo están en procesos como la regulación del ciclo celular y el transporte de electrones.

El *subcluster* E está constituido por tres agrupamientos (s29-s31). Entre las funciones moleculares representadas encontramos genes que codifican proteínas que presentan actividad como factores de crecimiento. Dentro de los procesos biológicos representados, encontramos un 2,46% de los genes implicados en el metabolismo de los carbohidratos, un 3,94% implicado en desarrollo y un 1,48% implicado en modificaciones proteicas

Entre las rutas de transducción de señal representadas de forma significativa encontramos la ruta de señalización de TGF β la ruta de señalización de Notch, ciclo celular, adhesiones focales y regulación del citoesqueleto de actina.

El *subcluster* F está constituido por tres agrupaciones (s32-s34) entre las que se encuentran diversas funciones moleculares y procesos biológicos representados de forma significativa. Dentro de las distintas funciones moleculares encontramos genes agrupados en función de su actividad como MAP quinasas fosfatasa (2,59%), como hidrolasas (11,21%), como protein tirosin fosfatasa (2,59%), como transportadores de electrones (3,45%), como moléculas estructurales (3,45%) y como factores de crecimiento (2,59%). De la misma forma existen genes agrupados en función de su capacidad para unirse a ciertas moléculas como a la heparina (3,45%) y a ácidos nucleicos (6,9%). Por otro lado, dentro de las funciones biológicas representadas encontramos genes implicados en el desarrollo del mesodermo (2,59%), en el transporte de protones (2,59%), en el transporte de electrones (5,17%) en la defosforilación de aminoácidos, en el arresto de ciclo celular (2,59%), en la señalización mediada por receptores de membrana (2,59%), en la regulación negativa durante la proliferación, en la neurogénesis (4,31%) y en el ciclo celular (3,45%).

Respecto a las distintas rutas de señalización, encontramos que dentro del *cluster* existen genes implicados en la ruta de señalización de las MAP quinasas y JAK-STAT, en ciclo celular y en la interacción de los receptores con las citocinas. Así mismo, aparecen genes implicados en patologías como la esclerosis lateral amiotrófica y las prionopatías.

El *subcluster* G presenta cuatro agrupaciones (s-35-s38). Entre las funciones moleculares representadas de forma significativa encontramos genes agrupados en base a su actividad como factores de transcripción de la ARN polimerasa II (3,8%) y su actividad helicasa (3,8%), así como en base a su capacidad de unión a metales (7,59%). De la misma forma entre los procesos biológicos encontramos genes implicados en la regulación de la transcripción desde el promotor de la ARN polimerasa (5,06%), en el ensamblaje de complejos proteicos (3,8%) y en procesos de adhesión celular (5,06%).

Una vez estudiado el *cluster* jerárquico generado a partir de los datos de expresión obtenidos del tratamiento con el A β 25-35, realizamos de nuevo un estudio similar a partir del *cluster* generado a partir de los datos de expresión obtenidos tras el tratamiento con el PrP106-126 (Figura 48).

Este *cluster* está constituido por nueve pequeños agrupamientos numerados o *subcluster* (SCA-SCJ), en los que se recogen aquellos genes más parecidos entre sí. De la misma forma que para los casos anteriores, todos ellos se integraron con anotaciones funcionales con el fin de encontrar posibles procesos tanto biológicos como moleculares representados en una mayor o menor proporción dentro de los distintos grupos.

Subcluster	Función Molecular		Proceso Biológico		Rutas Biológicas		Factores de Transcripción	
	Heatmap	P-value FDR Total G%	Heatmap	P-value FDR Total G%	Heatmap	Impact factor FDR	Transcription factor	Adjusted p-value
SCA		P-value FDR Total G% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2%		P-value FDR Total G% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2%	---	---	---	---
SCB		P-value FDR Total G% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2%		P-value FDR Total G% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2%	---	---	---	---
SCC		---	---	---	---	---	---	---
SCD		P-value FDR Total G% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2%		P-value FDR Total G% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2%	---	---	---	---
SCE		P-value FDR Total G% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2%		P-value FDR Total G% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2%	---	---	---	---
SCF		P-value FDR Total G% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2%		P-value FDR Total G% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2%	---	---	---	---
SCG		P-value FDR Total G% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2%		P-value FDR Total G% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2%	---	---	---	---
SCH		P-value FDR Total G% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2%		P-value FDR Total G% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2%	---	---	---	---
SCI		P-value FDR Total G% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2%		P-value FDR Total G% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2%	---	---	---	---
SCJ		P-value FDR Total G% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2%		P-value FDR Total G% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2% 0.0001 0.0001 1.1 11.2%	---	---	---	---

Figura 48. Clustering jerárquico y Ontología génica de los genes regulados por PR106-126. Se recogen los procesos moleculares, las funciones biológicas, las rutas de transducción y los sitios de unión putativos para factores de transcripción. Se aceptan como significativos los procesos con FDR<0.05. Se incluyen los genes regulados incluidos en cada una de las categorías (Total) y le porcentaje respecto al total de genes incluidos en cada proceso (%G).

El *subcluster* A (SCA) está constituido por dos agrupamientos (s1-s2), entre los que encontramos distintas funciones moleculares y procesos biológicos representados de forma significativa; Dentro de las funciones moleculares representadas encontramos genes con capacidad de unión a ADN (11,67%) de unión a ácidos nucleicos (9,17%) y de unión a Zn^{2+} (11,67%). Por otro lado, entre los procesos biológicos encontramos genes implicados en la transcripción (10%), así como en el transporte de iones Na^+ (2,5%).

El *subcluster* B (SCB) está constituido por seis pequeños agrupamientos (s3-s8). Entre las funciones moleculares representadas de forma significativa encontramos genes con capacidad de unión a ácidos nucleicos (8,11%), a ARN (4,86%), a iones Zn^{2+} (10,27%) y a nucleótidos (4,32%), de la misma forma existen genes con actividad ligasa (3,24%) y con actividad conjugadora de ubiquitina (1,62%). Dentro de los procesos biológicos representados de forma significativa encontramos genes implicados en la biosíntesis del colesterol (2,7%), en la reparación del ADN (2,7%), en la respuesta a estrés (1,62%) y en procesos de motilidad celular (1,62%). De la misma forma en este agrupamiento encontramos representada de forma significativa la ruta de proteólisis mediada por ubiquitina, y dos factores de transcripción Cdx-2 y FOXJ2.

El *subcluster* C (SCC), está formado por cuatro agrupamientos (s9-s13) y no se encuentran funciones moleculares, procesos y rutas biológicas significativas.

El *subcluster* D (SCD) está constituido por cuatro pequeños agrupamientos (s14-s17). Entre las funciones moleculares representadas de forma significativa encontramos por un lado, genes con capacidad de unión a Ca^{2+} (5,22%), a calmodulina (2,24%) y a proteínas (2,24%) y por otro, genes con actividad catalítica (2,99%). Entre los procesos biológicos representados encontramos genes implicados en la división celular (2,99%), en la regulación del ciclo celular (3,73%), en el catabolismo de proteínas dependiente de ubiquitina (2,24%), en el metabolismo (3,73%) y en ciclo celular (2,99%). Al igual que en el caso anterior existen numerosas rutas de transducción que están sobre-representadas significativamente en este agrupamiento, de forma que encontramos genes implicados en la ruta de Wnt, en la apoptosis, en la ruta de señalización mediada por receptores *toll-like*, en la proteólisis mediada por ubiquitina, en la ruta de señalización de las MAP quinasas y genes implicados en la formación de uniones adherentes y en el ritmo circadiano.

El *subcluster* E (SCE) está constituido por cinco agrupamientos de pequeño tamaño (s18-s22). Entre las funciones moleculares representadas de forma significativa encontramos genes con capacidad de unión a ácidos nucleicos (6,7%), a azúcares (2,06%) así como a ion Mn^{2+} (1,55%). Por otro lado existen genes agrupados en distintas funciones, en base a su actividad como moléculas adaptadoras SH3/SH2 (1,55%) o como quinasas (2,58%). Dentro de los procesos biológicos representados de forma significativa encontramos genes implicados en la transcripción (11,34%) y en la regulación de la transcripción dependiente de ADN (12,89%). Dentro de las rutas biológicas representadas encontramos genes implicados en la atrofia DRPLA y el sistema de señalización del fosfatidil inositol.

El *subcluster* F (SCF) está constituido por tres agrupamientos s23-s25. Entre las funciones moleculares representadas significativamente encontramos genes con actividad transferasa (9,26%), con actividad Serin-Treonin quinasa (5,56%), con actividad como moléculas estructurales (3,7%), como factores de transcripción (3,7%), como protein tirosin quinasas (3,7%), como quinasas (2,78%) y con capacidad de unión a azúcares

(2,78%). Entre los procesos biológicos encontramos representados de forma significativa genes implicados en la fosforilación de aminoácidos (6,48%).

El *subcluster* G (SCG) está constituido por cinco agrupamientos s26-s30. Sólo dos funciones moleculares se encuentran representadas de forma significativa en este agrupamiento, y en ellas encontramos genes que presentan actividad como factores de transcripción (7,88%) y genes que codifican para constituyentes estructurales del ribosoma (3,03%). Entre los procesos biológicos representados de forma significativa encontramos genes implicados en los procesos de transcripción (11,52%), en la regulación negativa de los procesos de transcripción (1,82%) en la defosforilación de aminoácidos (3,64%), en el ensamblaje de complejos proteicos (2,42%), en la transmisión sináptica (2,42%), en las adhesiones celulares dependientes de Ca^{2+} (1,82%) y en el transporte de lípidos (1,82%). Respecto a las rutas biológicas, sólo la de las MAP quinasas se encuentra representada de forma significativa en este agrupamiento.

El *subcluster* H (SCH) está constituido por tres agrupamientos s31-s33. Existen distintas funciones moleculares representadas de forma significativa, dentro de las que encontramos genes agrupados en base a su actividad como transductores de señal (8,04%), como coactivadores transcripcionales (5,36%) y como activadores transcripcionales (10,71%). igualmente encontramos genes que presentan actividad quinasa (2,68%) y actividad hidrolasa (7,14%). Entre los procesos biológicos encontramos genes implicados en la regulación de la transcripción dependiente de ADN (16,07%), en la defosforilación de aminoácidos, en el plegamiento de proteínas (3,57%) y en la transducción de señal (9,82%). Al igual que en el *cluster* anterior la única ruta de transducción representada de forma significativa es la ruta de las MAP quinasas.

El *subcluster* I (SCI) está constituido por cinco pequeñas agrupaciones s34-s38. Dentro de las funciones moleculares representadas significativamente encontramos genes con capacidad de unión a nucleótidos (5,51%). De la misma forma, dentro de los procesos biológicos representados encontramos genes implicados en la inducción de la apoptosis (2,36%) así como en la unión a nucleótidos (5,51%).

El *subcluster* J (SCJ) está formado por seis agrupamientos s39-s44. Dentro del agrupamiento existen numerosas funciones moleculares representadas de forma significativa entre las que se encuentran genes agrupados en función de su capacidad de unión a metales (0,68%), de unión a Zn^{2+} (0,58%), de unión a proteínas (0,39%), a ácidos nucleicos (0,48%). Igualmente existen genes agrupados en función de su actividad transferasa (0,39%), hidrolasa (0,29%), en función de su actividad como receptores (0,29%) y como factores de transcripción (0,39%). Entre las rutas biológicas representadas de forma significativa encontramos genes involucrados en patologías como la esclerosis lateral amiotrófica, las prionopatías, así como genes implicados en las *tigh junction*.

4.3 Análisis individual de genes regulados como consecuencia de la toxicidad inducida por el A β 25-35 y por el PrP106-126 y validación de los mismos por RT-PCR en tiempo real.

4.3.1 Validación por qRT-PCR en tiempo real.

Una vez se obtuvieron y analizaron los perfiles de expresión génica asociados a cada uno de los péptidos, a partir de los distintos grupos de genes regulados, se seleccionaron por un lado genes cuya expresión estaba modificada de forma específica por cada péptido, y por otro genes que se comportan de la misma forma por el

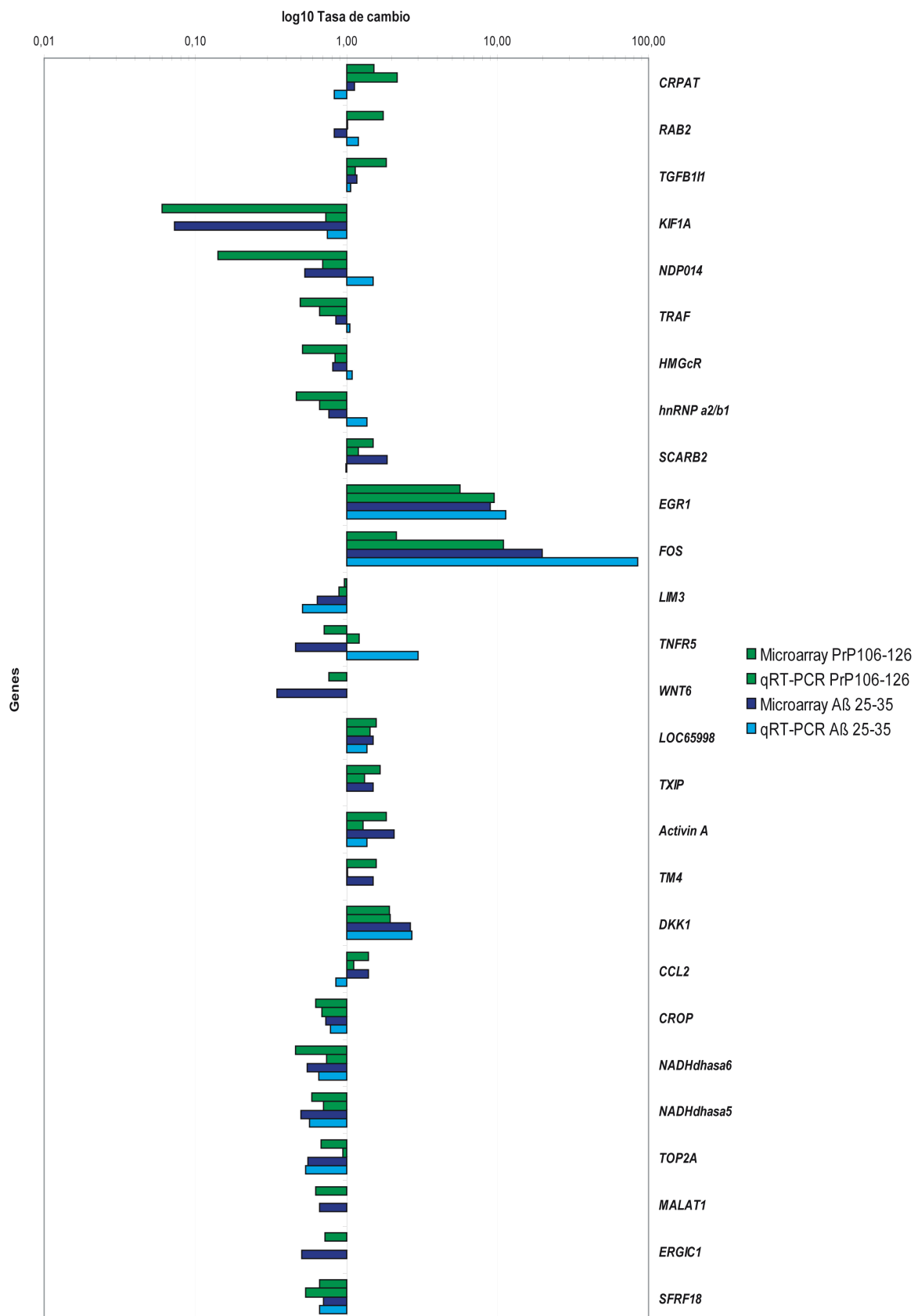


Figura 49. Niveles de expresión comparada entre *Microarrays* y qRT-PCR

efecto inducido por ambos péptidos (Figura 49). Para todos los casos, los genes fueron seleccionados en base al número de réplicas en el que estaban presentes, la tasa de cambio así como a su posible interés biológico. Los genes elegidos se analizaron mediante técnicas alternativas para el estudio de los niveles de expresión génica, buscando así tanto una confirmación de los resultados obtenidos en los *microarrays*, como un apoyo más a la hipótesis postulada.

De todos los genes regulados en los *microarrays*, 27 fueron seleccionados según los criterios anteriormente expuestos y analizados mediante PCR en tiempo real.

A partir de los resultados obtenidos de la PCR cuantitativa, observamos que 4 de los 8 genes regulados por el PrP106-126 (*KIF1A*, *NDP014*, *CRTAP* y *hnRNP a2/b1*) presentan el mismo sentido de cambio que en los *microarrays*, mientras que los otros 4 no se confirman por no presentar un cambio estadísticamente significativo.

Por otro lado, 3 de los 6 genes alterados por el tratamiento con A β 25-35 (*EGR1*, *FOS* y *LIM3/LMO3*), presentan regulaciones similares a los obtenidos en los *microarrays*. El gen *TNFR5* por su lado, se comporta de forma opuesta respecto al sentido del cambio y el gen *WNT6* no se consiguió detectar por qRT-PCR cuantitativa, aún cuando los niveles detectados por los *microarrays* parecen lo suficientemente grandes como para que pudieran ser confirmados por esta técnica alternativa. Aunque inicialmente estos genes fueron seleccionados como genes modificados por el tratamiento con A β 25-35, se analizaron también para el tratamiento con PrP106-126, encontrándose que tanto *fos* como *EGR1* se encontraban también sobre-expresados, mientras que *LMO3* no parecía estar regulado por el PrP106-126. Esto nos permite confirmar que existen genes que se regulan de forma similar y genes que presentan una regulación exclusiva por sólo uno de los tratamientos. En este caso *LIM3* estaría regulado exclusivamente por el A β 25-35.

En lo que respecta a los genes regulados de forma común por ambos tratamientos, encontramos que 5 de los 13 genes estudiados (*DKK1*, *CROP*, *NADH deshidrogenasa 5*, *NADH deshidrogenasa 6* y *SFRS18*) presentan un comportamiento equivalente en relación a la magnitud de cambio y al sentido del mismo. Por otro lado, genes como *TXIP*, *activina A*, *CXCL2* y *tropomiosina 4 (TM4)*, muestran una tendencia a corresponderse con los resultados obtenidos en los *microarrays* sólo desde el punto de vista del comportamiento pues sus niveles de cambio no son estadísticamente significativos. Finalmente, genes como *MGC3032* y *TOP2A* sólo se confirman para el PrP106-126 y A β 25-35 respectivamente.

Los datos obtenidos nos permiten observar que de los 27 genes seleccionados inicialmente, 15 han sido validados, mientras que los 12 restantes no. Por otro lado, algunos de los genes que habían sido seleccionados por estar regulados exclusivamente en uno de los tratamientos, como *FOS* y *EGR1* también presentan un cambio en los niveles de expresión en el otro tratamiento, a pesar de no haber sido detectado previamente en los *microarrays* (Figura 49). Estos resultados indican que aunque los *microarrays* constituyen una potente herramienta, tanto para el análisis de múltiples genes como para la creación de nuevas hipótesis pueden ser sin embargo una fuente de falsos positivos y de falsos negativos a nivel individual. Es por ello que todo resultado obtenido de un análisis de *microarrays*, no sólo ha de ser producto de un buen diseño experimental y de múltiples análisis, sino que debe ser siempre validado por técnicas moleculares alternativas que lo confirmen, especialmente si se pretenden sacar conclusiones a nivel individual. La confirmación de genes como *LIM3 (LMO3)* y *TOP2A*, reprimidos sólo en presencia de A β 25-35, o sobreexpresados sólo en presencia de PrP106-126, como *LOC65998*, permite esbozar

la idea de que ciertamente, deben existir rutas inducidas específicamente por el PrP106-126 o por el A β 25-35. Sin embargo, la existencia de genes activados en los dos tratamientos como *EGR1*, *FOS*, *DKK1*, *NADH deshidrogenasa 5* y *NADH deshidrogenasa 6* demuestra la existencia de algunos mecanismos efectores comunes en ambos procesos neurotóxicos.

4.2.3.2. Confirmación de genes regulados: Patrón de expresión temporal.

Una vez se validaron los resultados de los *microarrays* se trataron de reproducir los resultados en experimentos independientes. Para ello se realizó un estudio del comportamiento de los genes a diferentes tiempos de tratamiento incluyendo entre los tiempos estudiados el que utilizamos en el experimento de los *microarrays* (Figuras 50 y 51). Así, se estudiaron los patrones de expresión temporal de todos aquellos genes validados mediante qRT-PCR, considerando distintos tiempos: 3, 6, 9, 18 y 24 horas, y empleando la misma dosis de tratamiento utilizada hasta entonces (50 μ M). Esto permitió determinar cómo se comportan y cuál es el punto en el tiempo en el que la tasa de cambio en los niveles de expresión es mayor.

El gen ***EGR-1*** sufre un aumento gradual en los niveles de expresión tanto en el tratamiento con A β 25-35 como con PrP106-126 (Figura 50a). Aunque la sobre-expresión es patente y progresiva en ambos casos, existen pequeñas diferencias. Mientras que el tratamiento con el A β 25-35 induce un aumento acusado del mensajero ya a las 3 horas de tratamiento y obtiene su máximo valor a las 6 horas para luego ir reduciendo sus niveles a las 9 horas y a las 18 horas hasta conseguir los niveles mas bajos, aunque no todavía los basales, a las 24 horas, el tratamiento con el PrP106-126 induce una sobre-expresión en los niveles del mensajero incluso mayor que para el A β 25-35, pero la progresión en el tiempo es mas lenta, de forma que a las 3 horas, los niveles son bastantes mas bajos en relación a los niveles conseguidos con el A β 25-35 y poco a poco siguen aumentando a las 6 horas hasta alcanzar un máximo de expresión a las 9 horas, comenzando en este punto un descenso, también gradual, aunque menos acusado que para el A β 25-35, lo que lleva a la reducción de los niveles de ARN mensajero hasta las 18 horas. Ambos factores producen un claro aumento en los niveles del ARN mensajero pero a distinto ritmo, en efecto podemos decir que presentan patrones de expresión equivalentes con la misma tendencia y sin embargo diferentes en el tiempo.

Al igual que ***EGR-1***, ***FOS*** sufre un aumento gradual en los niveles de expresión tanto en el tratamiento con A β 25-35 como en el tratamiento con PrP106-126 (Figura 50b). De nuevo, aunque la sobreexpresión es acusada en ambos casos, y los patrones de expresión temporal presentan tendencias y comportamientos equivalentes, su consecución en el tiempo es ligeramente distinta, de forma que mientras que el tratamiento con A β 25-35, ya produce un aumento considerable en los niveles de mensajero a las 3 horas de tratamiento, el PrP106-126 sin embargo ha producido un discreto aumento del mismo en ese tiempo.

Por otro lado, mientras el A β 25-35 induce a las 6 horas el máximo nivel de expresión del mensajero, el PrP106-126 produce un aumento en los niveles de mensajero más gradual, de forma que los valores obtenidos en este punto son equivalentes o ligeramente inferiores a los obtenidos por el A β 25-35 a las 3 horas de tratamiento. Mientras a las 9 horas los niveles de mensajero comienzan a descender ya para el A β 25-35, para el PrP106-126 se alcanza el máximo valor en este tiempo. A las 18 horas el nivel del mensajero desciende en ambos tratamientos hasta presentar una magnitud equivalente, mostrando en ambos casos los niveles más bajos. Finalmente tanto para el A β 25-35 como para el PrP106-126 vuelve a existir un ligero aumento a las 24 horas más patente en el caso del PrP106-126 (Figura 50b).

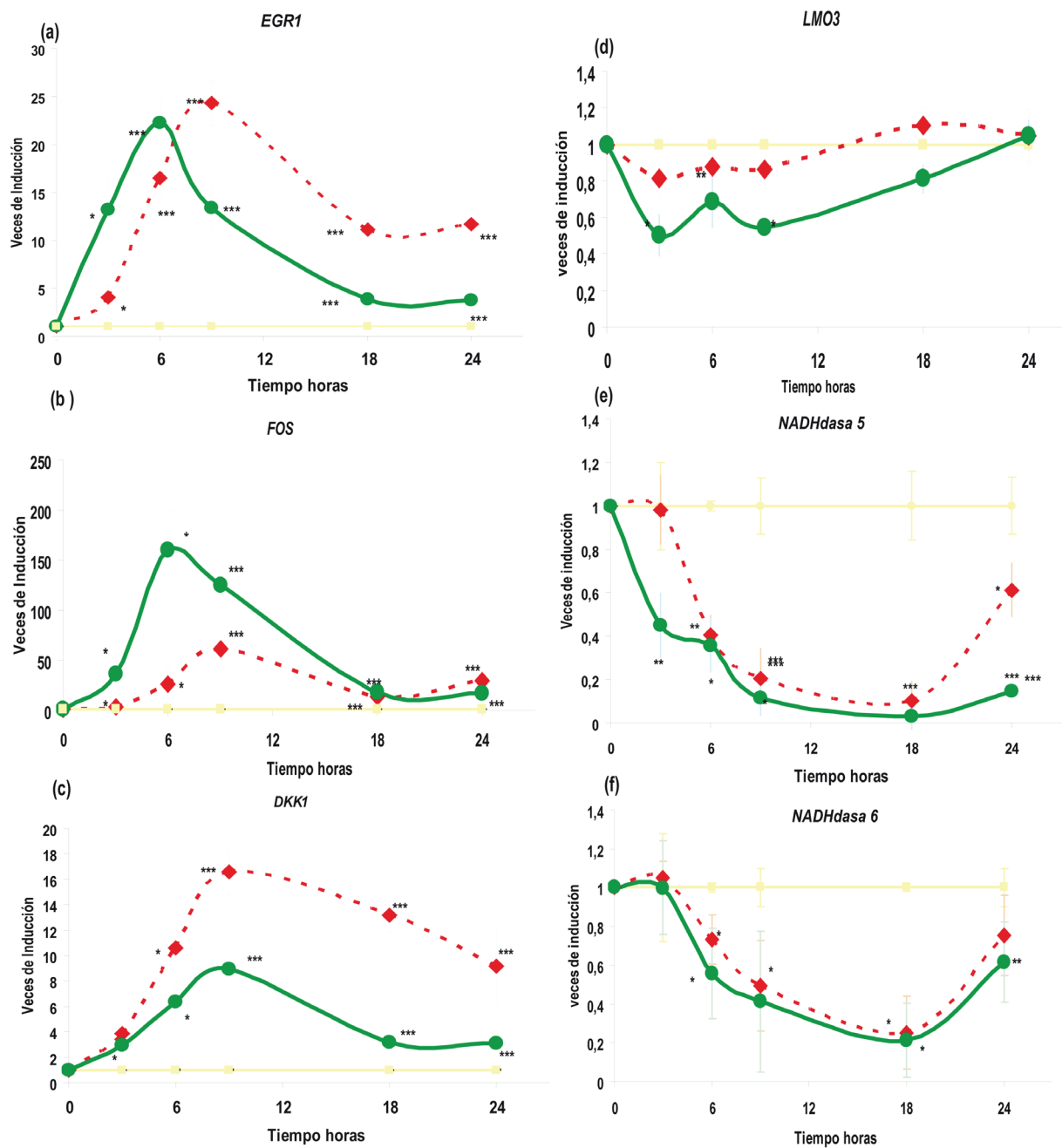


Figura 50. Patrones de expresión temporal de los genes *EGR1*, *FOS*, *DKK1*, *LMO3*, *NADHdasa 5* y *6*. Se realizó un estudio del patrón de expresión temporal con una dosis de 50 μ M para el PrP106-126 y para A β 25-35. En él se incluyeron los tiempos de 3, 6, 9, 18 y 24 horas. La determinación de la significancia estadística, se llevó a cabo mediante el test estadístico "t" de Student de dos colas para muestras pareadas donde, * indica una $p < 0.05$, ** indica una $p < 0.01$, y *** indica una $p < 0.001$. a) *EGR-1*. b) *FOS*. c) *DKK1* d) *LMO3*. e) *NADHdasa 5*. f) *NADHdasa 6*. (PrP 106-126) — (A β 25-35) y — (Control).

Tanto *EGR-1* como *FOS* son dos genes tempranos, que en condiciones normales se activan en respuesta a estímulos de estrés celular y presentan respuestas de activación e inhibición bastante rápidas, curiosamente ambos presentan los máximos niveles de expresión a las 6 y a las 9 horas tanto para el A β 25-35 como para el PrP106-126 respectivamente, esto podría estar indicando un efecto mantenido en el tiempo de ambos factores, lo que se refleja en la alteración de la expresión génica a tiempos tan largos.

El gen *DKK1* presenta un patrón de expresión temporal equivalente para ambos factores, de forma que a las 3 horas comienza a darse un aumento gradual en los niveles de mensajero, que alcanza su máximo a las 9 horas donde comienzan a descender hasta las 18 horas. Aunque el perfil de expresión temporal es equivalente para ambos péptidos, la magnitud del cambio es casi el doble para el PrP106-126 en todos los puntos del estudio temporal. En ambos casos la reducción en los niveles de mensajero a partir del punto máximo alcanzado a las 9 horas es gradual sin llegar a alcanzar en ninguno de los casos los niveles basales iniciales, esto indica que se tratan de efectos mantenidos en el tiempo lo que hace pensar que pudieran presentar una expresión mantenida en el tiempo, o bien una regulación transcripcional indirecta. Esto es más patente en el caso del PrP106-126, en el que los niveles de mensajero son aún muy elevados a las 24 horas, indicando que la recuperación de los mismos es mucho más lenta. En el caso del A β 25-35 una vez se han alcanzado los niveles mas bajos a las 18 horas, estos se mantienen en el mismo nivel hasta las 24 horas (Figura 50c).

El gen *LMO3* sufre un descenso en los niveles de expresión patente ya a las 3 horas de forma exclusiva para la toxicidad inducida por el A β 25-35. Esta reducción se mantiene, hasta las 9 horas, a partir de las cuales se inicia una recuperación de los niveles de expresión progresiva, llegando a equipararse a los encontrados para el control a las 24 horas. El hecho de que la reducción más fuerte se encuentre a las 3 horas, hace pensar que la regulación del gen por el A β 25-35, podría comenzar antes, tratándose de una regulación temprana, directamente dirigida por el propio factor (Figura 50d). Por el contrario, aunque PrP no produce ningún efecto estadísticamente significativo sobre los niveles de este gen, sí que se aprecia una cierta tendencia a mimetizar (aunque con una menor potencia) el efecto de A β 25-35.

El gen *NADH deshidrogenasa 5* sufre una reducción progresiva apreciable desde las 6 horas, con un máximo a las 18 horas y que se mantiene a las 24 horas. El comportamiento del gen para los dos factores es similar de forma general ya que en ambos se produce una represión gradual de la expresión, sin embargo existen pequeñas diferencias. Mientras que el gen presenta niveles de expresión similares al control a las 3 horas de tratamiento con PrP106-126, en el tratamiento con A β 25-35, la reducción de los niveles de expresión ya es considerable. Sería interesante entonces, analizar el comportamiento de este gen a tiempos anteriores, para determinar cuándo comienza la regulación del mismo por el A β 25-35. Por otro lado, mientras a las 24 horas existe una recuperación progresiva de los niveles de expresión para el PrP106-126, para el A β 25-35 esta recuperación también existe, sin embargo ésta es mucho más sutil, de forma que los niveles siguen siendo muy bajos. Esto nos permite deducir, que el efecto del A β 25-35, es mantenido en el tiempo, de forma que el inicio de la regulación del gen parece ser más temprana que en el caso del PrP106-126 y también parece que se mantiene durante más tiempo, a diferencia de lo que ocurre con el PrP106-126 (Figura 50e).

El gen *NADH deshidrogenasa 6*, por su lado, presenta igualmente un comportamiento totalmente equivalente para los dos factores, de forma que presentan una reducción temporal progresiva, desde las 6 horas que de nuevo se hace máxima a las 18 horas y se mantiene incluso a las 24 horas donde en ambos casos se observa una recuperación progresiva de los niveles de expresión (Figura 50f)

Tanto el gen *NADH deshidrogenasa 5* como el gen *NADH deshidrogenasa 6* (Figura 50e y f, respectivamente) presentan reducciones en la expresión génica a tiempos cortos, sin embargo la reducción máxima en ambos casos sucede a las 18 horas, lo que hace pensar en que éstos pudieran ser genes intermedios, con una expresión mantenida en el tiempo, o bien con una regulación transcripcional indirecta y/o a nivel traduccional.

El gen *SFRS18* presenta un patrón de expresión temporal equivalente tanto para el A β 25-35 como para el PrP106-126, de forma que a las 3 horas existe una reducción en los niveles de expresión en ambos casos aunque de mayor magnitud para el A β 25-35. A las 6 horas, mientras para el PrP106-126 los niveles de mensajero se mantienen, para el A β 25-35 aumentan ligeramente. A las 9 horas se alcanza la máxima reducción en los niveles de mensajero tanto para el A β 25-35 como para el PrP106-126, y a partir de este punto comienza una recuperación progresiva y significativa de los mismos, siendo ligeramente más lenta para el A β 25-35 (Figura 51a).

El gen ***TOP2A*** también presenta un perfil de expresión temporal similar para ambos factores, con una represión transitoria en los niveles de expresión aunque con pequeñas diferencias. Mientras que el A β 25-35 reduce los niveles de mensajero ya desde las 3 horas, el PrP106-126 no lo hace hasta las 6 horas de tratamiento, donde se alcanzan los máximos niveles de represión y de forma más sutil que para el caso del A β 25-35. La recuperación de los niveles de mensajero se produce rápidamente a las 9 horas del tratamiento para ambos factores, manteniéndose a partir de ese momento a niveles similares al control en tiempos posteriores. El hecho de que la represión máxima se produzca a tiempos cortos (6 horas) hace pensar que el tipo de regulación transcripcional génica ejercida por ambos factores es de tipo directo (Figura 51b).

El gen ***CROP*** sufre una represión transcripcional transitoria máxima a las 3 horas de tratamiento, y tan sólo para el tratamiento con el A β 25-35, ésta reducción en los niveles de mensajero se recupera rápidamente ya a las 6 horas, y a partir de este tiempo los niveles se mantienen constantes hasta el tiempo máximo de tratamiento. Esta rápida represión lleva a pensar que se trata de efectos transcripcionales directamente ejercidos por el A β 25-35 (Figura 51c).

El gen ***LOC65998*** presenta un comportamiento bifásico, en el que inicialmente se aprecia una represión transcripcional rápida a las 3 horas tanto para el tratamiento con A β 25-35 como para el tratamiento con el PrP106-126 y a continuación a las 6 horas en ambos casos existe un aumento significativo en los niveles de mensajero de magnitud similar. A partir de ese punto se produce una disminución en los niveles de mRNA que es progresiva para el tratamiento con PrP hasta alcanzar valores similares a las condiciones iniciales al final del estudio, mientras que es mucho más pronunciada en el tratamiento con A β , de forma que a las 9 horas se produce de nuevo una represión transcripcional que baja hasta niveles inferiores a los iniciales (Figura 51d).

El patrón de expresión temporal del gen ***KIF1A*** presenta un perfil de expresión plano desde el punto de vista estadístico, incluso en el tiempo de las 6 horas que supone un punto de referencia como confirmación de su regulación negativa por PrP respecto a los resultados obtenidos en los *microarrays* (Figura 51e). De todas formas, se aprecia una tendencia no significativa a una modulación positiva temprana (a las 3 horas) para ambos factores, volviendo a niveles similares o inferiores a los basales a partir de ese momento, pero siempre en un rango de variación no significativa.

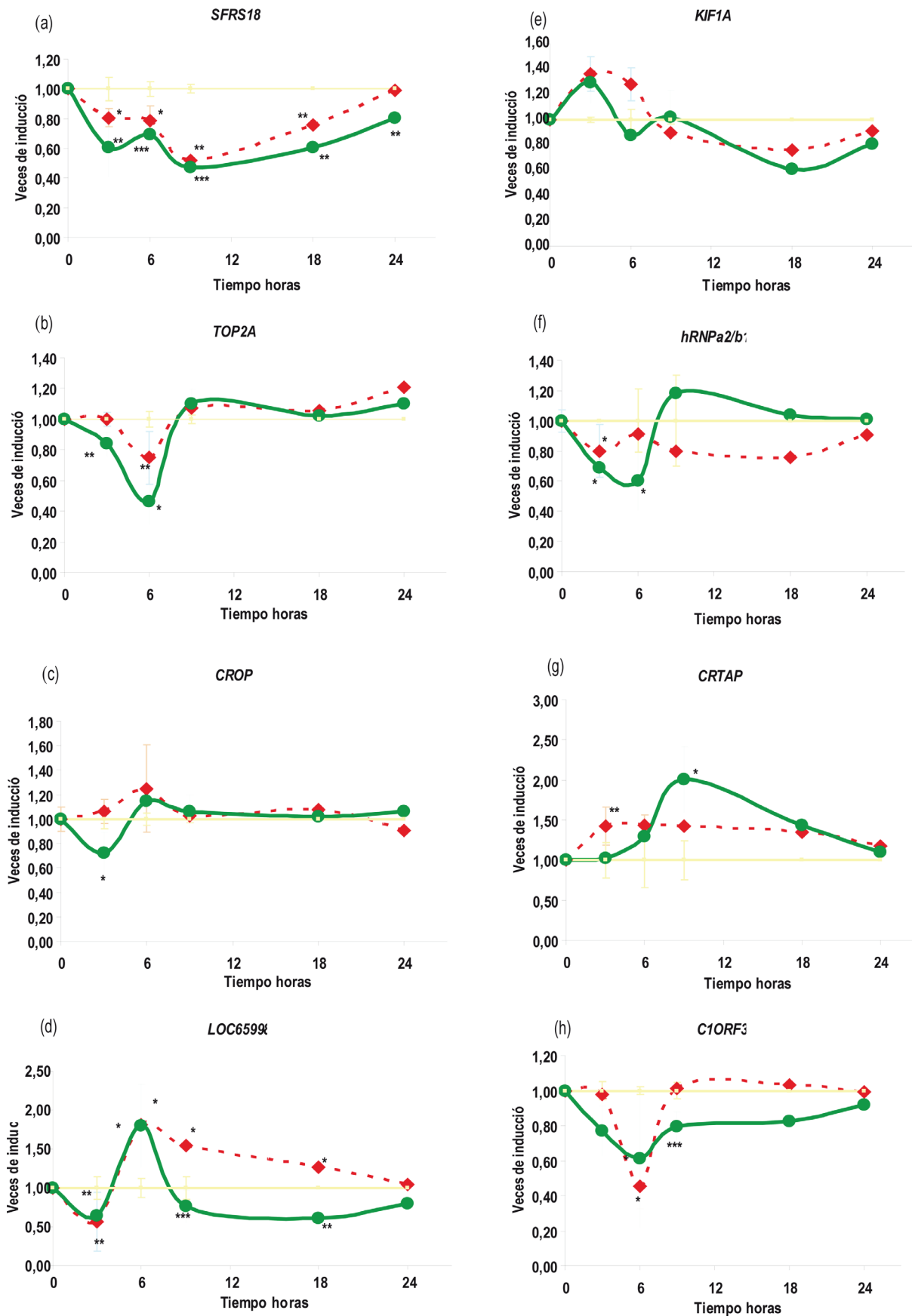


Figura 51. Patrones de expresión temporal de los genes *SFRS18*, *TOP2A*, *CROP*, *LOC86998*, *KIF1A*, *hRNPa2/b1* y *C10RF6*. Se realizó un estudio del patrón de expresión temporal con una dosis de 50 μ M para el PrP106-126 y para A β 25-35. En él se incluyeron los tiempos de 3, 6, 9, 18 y 24 horas. La determinación de la significancia estadística, se llevó a cabo mediante el test estadístico "t" de Student de dos colas para muestras pareadas donde, * indica una $p < 0.05$, ** indica una $p < 0.01$, y *** indica una $p < 0.001$. a) *SFRS18* b) *TOP2A* c) *CROP* d) *LOC65998* e) *KIF1A* f) *hRNPa2/b1* g) *CRTAP* h) *C10RF6*. (PrP 106-126) — (A β 25-35) y — (Control).

El gen **hnRNPa2/b1** presenta patrones de expresión diferentes para cada uno de los factores empleados, de forma que el A β 25-35 induce una represión transcripcional ya patente a las 3 horas de tratamiento, represión que alcanza su máximo valor a las 6 horas. A partir de este punto se van recuperando los niveles de mensajero, volviendo a niveles equivalentes o incluso superiores respecto al control a las 9 horas. El PrP106-126 por su lado induce una ligera represión transcripcional significativa a las 3 horas de tratamiento. A partir de este momento los niveles se recuperan aunque sin alcanzar en ningún momento exactamente el mismo valor que en las condiciones control, aunque la diferencia aquí no es significativa desde un punto de vista estadístico (Figura 51f).

El gen **CRTAP** presenta patrones de expresión temporales distintos para ambos factores. Mientras que el A β 25-35 produce una activación transcripcional con un máximo a las 9 horas, lo que lleva a pensar que bajo estas condiciones este gen podría sufrir una regulación de tipo indirecto, o bien a nivel traduccional; el PrP106-126 induce por su lado una pequeña activación transcripcional ya a las 3 horas que se mantiene en el tiempo pero que va reduciéndose de forma sutil hasta conseguir niveles de mensajero equiparables al control. Una regulación transcripcional con un máximo de expresión a las tres horas puede estar revelando que este gen bajo estas condiciones experimentales podría estar comportándose como un gen temprano, presentando una regulación directamente ejercida por el propio factor (Figura 51g).

El marco abierto de lectura **C1ORF63** presenta patrones de expresión temporal similar en el tratamiento con el A β 25-35, o con el PrP106-126, aunque con un curso temporal ligeramente distinto. Mientras que el A β 25-35 produce una represión transcripcional gradual, de forma que a las 3 horas los niveles de mensajero ya están por debajo del control y las 6 horas alcanza la represión máxima, el PrP106-126 produce una drástica y puntual bajada en los niveles de ARN mensajero a las 6 horas. En ambos casos, a partir de este punto, comienza la recuperación de los niveles de mensajero respecto al control, pero ésta es ligeramente diferente para cada uno de los factores. Para el A β 25-35 al igual que la represión, la recuperación de los niveles de mensajeros es también lenta y gradual, produciéndose en un intervalo temporal amplio que abarca 18 horas. Para el PrP106-126 sin embargo existe una recuperación igualmente rápida que la represión producida, de forma que a las 9 horas los niveles ya se han recuperado totalmente y se mantienen constantes hasta las 24 horas, esto podría estar indicando que los efectos ejercidos a nivel transcripcional por el PrP106-126 sobre este gen son efectos directos (Figura 51h).

5. DISCUSIÓN.

La enfermedad de Alzheimer y las prionopatías son enfermedades neurodegenerativas progresivas e irreversibles del sistema nervioso central que cursan con deterioro cognitivo y grandes alteraciones moleculares y celulares. Ambas patologías parecen estar directamente relacionadas con la acumulación de proteínas que se expresan naturalmente en la célula y presentan funciones biológicas específicas cuyo plegamiento anómalo induce su depósito en agregados amiloideos generando graves lesiones y alteraciones funcionales en el neuropilo. En los últimos años son múltiples las similitudes neuropatológicas, epidemiológicas, bioquímicas y genéticas que se han encontrado entre ambas patologías, incluso se han llegado a describir rutas de señalización e interacciones directas entre las dos proteínas principalmente implicadas en ambos procesos patológicos (A β y PrP) ^(137, 175, 195, 243).

De la misma forma durante muchos años han sido numerosos los estudios clinicopatológicos y neuroradiológicos que han tratado de poner de manifiesto, cómo la activación de la microglia sería un evento patogénico relativamente temprano y central en ambos procesos neurodegenerativos ^(24, 38, 58, 160). La activación de la microglia podría ser una de las principales causas de los daños neuronales producidos en ambas patologías siendo la neurodegeneración resultado de la maduración de los complejos fibrilares proteicos favorecida por efecto de la propia glía ^(57, 198, 264, 273). A pesar de que la gran mayoría de los estudios publicados al inicio de este estudio manifestaban un papel fundamental de la glia en el inicio y la progresión de ambas patologías, otros estudios minoritarios sugerían como también los agregados amiloideos podrían ser tóxicos actuando sobre la neurona y contribuyendo de forma directa a la aparición de los eventos que anteceden a la muerte neuronal en ausencia de la glia tanto en la enfermedad de Alzheimer ^{(8) (11, 71, 249)} como en las prionopatías ^(2, 112).

El poder dilucidar cuáles eran los procesos neurotóxicos y moleculares que precedían a la muerte neuronal previa a las disfunciones y deterioros cognitivos tan característicos de ambas patologías, despertó en nosotros un gran interés en poder determinar cuáles eran las bases moleculares subyacentes a la toxicidad directamente inducida sobre la neurona por los agregados amiloideos tan característicos de ambas enfermedades, así como en plantearnos si podrían existir mecanismos celulares y moleculares comunes que pudieran explicar todas las coincidencias descritas.

Al tratarse de enfermedades altamente complejas en las que numerosos factores contribuyen al entorno tóxico en el que se desarrollan los distintos eventos patológicos, decidimos emplear unas condiciones experimentales sencillas. Para ello seleccionamos un modelo exclusivamente neuronal con ausencia de glia con el que pretendíamos demostrar por un lado cómo los péptidos A β y PrP pueden actuar directamente sobre la neurona provocando numerosos cambios moleculares y fenotípicos que precipitan a las neuronas a la muerte celular, y por otro lado describir los mecanismos subyacentes a la toxicidad directamente asociada a ambas proteínas. Con todo trataríamos de dilucidar rutas y mecanismos de acción por los que esta toxicidad se desarrolla ya en los estadios más tempranos de ambos procesos patogénicos y aún más, determinar si estos mecanismos pudieran ser comunes en ambos grupos patológicos, lo que permitiría el desarrollo de terapias comunes en un futuro si así quedara demostrado.

Como modelo neuronal empleamos células SH-SY5Y, un neuroblastoma humano ampliamente descrito y utilizado en el estudio de enfermedades neurodegenerativas ^(28, 52, 101, 217, 261) y para emular la toxicidad inducida *in vivo* por los péptidos A β 1-42 y el PrP^{sc} empleamos los fragmentos proteicos A β 25-35 y PrP106-126, que han sido utilizados por numerosos grupos como modelos representativos de la toxicidad inducida por A β 1-42 y el PrP^{sc} pues retienen las propiedades tanto físicas como biológicas que le confieren la toxicidad a los péptidos completos ^(74, 105, 289) además de formar agregados fibrilares altamente tóxicos para las neuronas ^{(23) (24, 82, 96)}.

Para poder estudiar de una forma global y desde un nivel de abstracción mayor los cambios moleculares que se producen en neuronas expuestas a los péptidos neurotóxicos A β 25-35 y PrP106-126, empleamos

microarrays de expresión de *Affymetrix*, que constituyen una de las herramientas mas poderosas, flexibles y de alto rendimiento que permiten valorar el cambio en los perfiles de expresión de miles de genes. Una vez se realizó la optimización del sistema, se demostró mediante ensayos de viabilidad celular y mediante la detección de distintos marcadores apoptóticos (caspasa 3, PARP y fragmentación nuclear), cómo los péptidos A β 25-35 y PrP106-126 eran capaces de inducir directamente la muerte de las neuronas en procesos dependientes de dosis y tiempo. Entonces, analizamos el perfil de expresión génica asociado a la exposición más temprana de los péptidos A β 25-35 (A β) y PrP106-126 (PrP), con el fin de describir los eventos moleculares desencadenados en los estadios más prematuros de la neurotoxicidad y evitando aquellos eventos moleculares y de señalización secundarios desencadenados como consecuencia de la aparición de segundos mensajeros.

Un análisis primario de los datos puso de manifiesto la existencia de un cambio relativamente grande en el número de sondas para ambos grupos experimentales (A β y PrP) respecto al grupo control, siendo 4629 sondas en el grupo correspondiente al A β 25-35 y 3539 en el grupo correspondiente al PrP106-126. Aunque el número total de sondas que ven modificada su expresión como consecuencia de cada uno de los tratamientos es similar, cerca de 4000, es llamativo observar como la mayoría de las sondas afectadas aparecen reprimidas en el caso del PrP (1800), mientras que la mayoría de ellas aparecen sobre-expresadas en el caso del A β 25-35 (2279). A pesar de estas diferencias, existe un no despreciable número de sondas (1122) que cambian su expresión en la misma dirección, lo que podía ser un indicio de mecanismos análogos en el proceso neurotóxico de ambos péptidos. Son numerosos los grupos que han empleado *microarrays*, para determinar los cambios de expresión asociados a las dos patologías tanto *in vitro* como *in vivo* ^(12, 40, 132, 241, 281) presentando resultados muy diversos que difieren de los nuestros y entre sí. Sin embargo esto no es sorprendente pues los resultados obtenidos en este tipo de ensayos a gran escala dependen enormemente de las condiciones y diseño experimental, de la plataforma que se ha empleado para su realización así como del posterior análisis e integración de los datos y herramientas que se emplean para ello. A pesar de que este tipo de trabajos experimentales tienen un gran potencial para plantear nuevas hipótesis, establecer asociaciones desconocidas o no obvias entre determinadas rutas o procesos biológicos y adquirir una visión global de una determinada condición experimental biológica o patológica, conviene no olvidar que sólo es posible extraer conclusiones muy globales de los datos obtenidos mediante la anotación e integración funcional de los genes en procesos y rutas biológicas que servirán como punto de partida de nuevas hipótesis de trabajo que permitirán llegar a un conocimiento profundo de las condiciones biológicas y/o patológicas estudiadas, una vez estos hayan sido validados por técnicas alternativas y reproducidos en experimentos independientes que determinen la robustez de los mismos.

Realizado el experimento y obtenidos los datos crudos, tras un procesamiento exhaustivo de los datos mediante el empleo de distintas aplicaciones bioinformáticas obtuvimos gran cantidad de genes regulados para cada uno de los grupos experimentales que fueron anotados ontológicamente e integrados con funciones moleculares o rutas biológicas perfectamente caracterizadas. Una de las primeras conclusiones que podemos sacar de los resultados obtenidos, es que tanto el A β 25-35 como el PrP106-126 desencadenan mecanismos específicos de señalización molecular asociados a cada uno de los péptidos. De hecho la mayoría de los procesos alterados para cada uno de los grupos experimentales son diferentes, lo que pone de manifiesto claras diferencias en el mecanismo de acción de cada uno de los péptidos durante el proceso neurotóxico. Sin embargo, a pesar de estas diferencias, existen procesos enriquecidos comunes tanto a nivel biológico, molecular y de señalización que pueden indicar un mecanismo neurotóxico común, y en consecuencia, posibles vías de actuación terapéutica comunes. Para poder llegar a conclusiones respecto a si estos procesos se ven alterados de la misma manera y en una dirección similar, haciendo que los cambios registrados en las células a nivel transcripcional y de expresión génica determinen un destino final equivalente en el contexto neurotóxico del A β y del PrP es necesario estudiar

en detalle qué genes se ven afectados en cada uno de los procesos anotados, el peso específico de los mismos dentro de cada ruta y la relevancia de cada uno de ellos en relación con otras rutas de señalización. Esto es lo que trataremos de discutir a continuación.

En relación con los procesos comunes descritos encontramos a nivel molecular procesos con un nivel de abstracción muy general como son proteínas con capacidad de unión a ácidos nucleicos (9,31% Aβ y 12,17% PrP), a ARN (4,03% Aβ y 5,4% PrP), a proteínas (25,45 % Aβ y 28, 9%) y genes que codifican proteínas con actividad de receptor acoplada a proteínas G (0,81% Aβ y 0,53% PrP). A nivel biológico de nuevo encontramos algunos procesos enriquecidos bastante generales como genes que codifican proteínas implicadas en la transcripción (7,75% Aβ y 8,78% PrP), y el procesamiento del ARN (1,72% Aβ y 2,32% PrP), pero también otros incluidos en un nivel de abstracción más detallado como genes que codifican proteínas con función de receptor y acopladas a proteínas G (0,98% Aβ y 0,92% PrP), implicados en la regulación transcripcional dependiente de la ARN polimerasa II (1,13% Aβ y 1,45% PrP), en la división celular (1,48% Aβ y 2,15% PrP), en ciclo celular (2,38% Aβ y 3,72 % PrP), en mitosis (1,16% Aβ y 1,71% PrP) y en la transición de G1/S dentro del programa de división celular mitótico (0,42% Aβ y 0,62% PrP). Por último entre las rutas de señalización alteradas de forma común encontramos: la ruta de P53, Ciclo celular, proteólisis mediada por ubiquitina, la ruta de señalización de las gonadotropinas y de las MAPquinasas así como diversas rutas implicadas en procesos tumorales como el cáncer prostático, el carcinoma celular renal y el cáncer colorrectal. Entre todos los procesos enriquecidos resulta llamativo ver cómo para cada una de las categorías ontológicas existe una clara alteración de numerosos eventos relacionados con la división, la mitosis y el control del ciclo celular.

El ciclo celular es un conjunto ordenado de sucesos que conducen al crecimiento de la célula y consta de cuatro fases diferentes: G1-S-G2 y M. La fase S, en la que se produce la replicación del ADN, la fase M en la que se produce la mitosis y la citocinesis y las fases G1 y G2, o fases de intervalo que separan las anteriores ⁽¹⁷⁾. A lo largo del todo el ciclo se elaboran mecanismos de retroalimentación y puntos de control que aseguran su correcto funcionamiento. Bajo determinadas condiciones biológicas o patológicas la aparición de determinadas señales extracelulares o ambientales puede hacer que una célula entre en ciclo celular de forma anómala contribuyendo a la aparición de determinadas patologías. La transición a través de las distintas fases de ciclo es controlada por proteínas reguladoras que fluctúan rápidamente en su expresión durante su progresión. Dentro de este grupo encontramos las CDCs, las CCNs, las CDKs y las CDKIs ⁽¹⁷⁾

Cuando en nuestro estudio analizamos los genes que se encuentran alterados por Aβ en las categorías ontológicas de ciclo celular, mitosis y transición G1/S (*Anexo II_Resultados_Aβ_Reg*), encontramos sobreexpresados numerosos genes que codifican proteínas implicadas en las fases tempranas del ciclo, lo que indicaría una activación del ciclo como consecuencia del contacto directo del Aβ con la célula. Entre estos genes sobreexpresados encontramos algunos tan importantes como las ciclinas D1 (*CCND1*) y D3 (*CCND3*) que se expresan específicamente en la fase de transición de G1/S. Ambas actúan como subunidades reguladoras activando al complejo, formado por las quinasas dependientes de ciclinas CDK4 y CDK6 ⁽²¹¹⁾ que fosforilan a la proteína Retinoblastoma (Rb), promoviendo la transición G1/S y la trans-activación de genes imprescindibles para la progresión en S por la liberación de factores de transcripción E2F que se acumulan en G1 ^(211, 221, 274). Este es el caso de *CDC6*, también sobre-expresada por efecto del Aβ, que es transcrita en G1 donde presenta sus niveles de expresión más elevados y es fundamental para la iniciación de la replicación además de participar en el mantenimiento de los puntos de control que coordinan la fase de síntesis y mitosis ⁽²¹⁾. De la misma forma, los niveles de expresión de Retinoblastoma (Rb) se encuentran elevados y los de Rb1L (p107), un regulador negativo de ciclo que impide la progresión en G1 ⁽¹³¹⁾, se encuentra reprimido. Todo parece apuntar que existiría activación transcripcional resultante de la fosforilación de Rb y una progresión por la inhibición de moléculas que actúan como

represoras de ciclo. No sólo *CDC6* se encuentra sobreexpresada por efecto del A β , también *CDK1* que codifica una proteína que participa activamente en la progresión de G1 a S, preparando la entrada en síntesis al fosforilar distintos sustratos que contribuyen a la progresión en ciclo ⁽⁶¹⁾. *CDK1* y *CDC6* están muy interrelacionados así una vez han aumentado los niveles de *CDC6* en G1 durante las primeras etapas de S, ésta es inhibida a través de una fosforilación mediada por *CDK1* ⁽⁵⁰⁾. Otro de los genes que presenta una función reguladora crítica en el ciclo es *CDC25A* y que también está sobre-expresado. Este codifica una fosfatasa dual específica cuya expresión aumenta notablemente en respuesta a determinados estímulos en distintas fases del ciclo, siendo importante para la progresión en síntesis, donde la proteína es fosforilada y aumenta su actividad fosfatasa activando el complejo *CDK2/CDCE* por defosforilación de dos residuos inhibitorios, y también favorece la entrada en G2/M mediante la activación del complejo *CDK1/CDCB* ⁽²⁵⁷⁾.

No sólo existen cambios en genes implicados en las fases más tempranas del ciclo celular, sino que existen otros implicados en las fases más avanzadas G2 y M, así como en la segregación cromosómica. Entre otros encontramos *CCNA2*, *SFN* y *GADD45A*. La ciclina A2 (*CCNA2*), reprimida por efecto del A β , en condiciones normales presenta su pico de actividad máxima en la fase G2 tardía aunque se acumula en S ⁽²¹¹⁾ donde activa a *CDK2* ^(60, 201), aunque también puede asociarse a *CDK1* cumpliendo funciones reguladoras durante G2 y M ^(202, 203). Ha sido descrito como la pérdida funcional de esta ciclina resulta en un fallo en la replicación del ADN ^(81, 192), por ello una represión del gen que codifica para esta proteína podría estar indicando una alteración del ciclo una vez ya se hubiera iniciado. Otra proteína fundamental que participa en el punto de control G2 de ciclo es la proteína 14-3-3 codificada por el gen *SFN*, muy inhibido por efecto del A β en nuestro experimento. Esta proteína se induce notablemente en respuesta al daño en el ADN contribuyendo a un arresto del ciclo celular en G2 ⁽⁹⁷⁾. Experimentos realizados con células *knock-out* para 14-3-3 (*14-3-3 -/-*) demuestran cómo tras la inducción de daño en el ADN, la ausencia de esta proteína hace que las células no consigan llegar al arresto celular en G2, debido al secuestro de *CDC2* y la ciclina B, lo que las precipita a una muerte mitótica, debido a la entrada en mitosis con daños en el ADN ⁽⁴¹⁾. La represión de este gen podría por tanto impedir la detención de la entrada anómala en ciclo en el segundo punto de control G2, favoreciendo entonces la progresión en mitosis con daños en el ADN.

Otro de los genes que presenta aumentado su nivel de expresión es *GADD45A*, que codifica la proteína *GADD45 α* , y normalmente aumenta sus niveles de expresión cuando existe un daño en el ADN bajo determinadas condiciones de estrés ambiental y tras la activación previa de las rutas P38/JNK ⁽²⁵²⁾. *GADD45 α* al igual que 14-3-3 forma parte del punto de control que existe en G2, y estabiliza a P53 en respuesta a daño en el ADN aumentando sus niveles de expresión junto con los de p21 y BAX ⁽¹¹⁴⁾. El aumento en los niveles de expresión de este gen, una vez más muestra cómo existe una alteración en el ADN como consecuencia del contacto directo y mantenido con el péptido A β .

Entre los genes que ven afectada su expresión por efecto del A β , existen también numerosas proteínas implicadas en la formación y mantenimiento del huso mitótico: *ASPM*, *CENPE*, *MAP9* y la segregación cromosómica como *BUB-1*, *MAD1L*, *TLK-1* y *2*, *NEK2* que están reprimidas.

Mientras que *ASPM* se localiza en el centrosoma durante la interfase y en los polos del huso mitótico durante la profase y hasta la telofase durante la mitosis ⁽⁹⁹⁾, *CENPE* es una proteína motora asociada al centrómero que se acumula en la fase G2 del ciclo y aparece en la región centromérica durante la prometafase ⁽²⁹¹⁾ y es responsable del movimiento de los cromosomas y el alargamiento del huso mitótico. La ausencia de *CENPE* lleva a la mala segregación de los cromosomas, además de a un retraso en la mitosis ⁽²²⁴⁾. Por otro lado *MAP9* está asociada a microtúbulos y es importante en la formación del huso mitótico, citocinesis y la progresión en mitosis. Su desregulación resulta en profundos defectos mitóticos que finalizan en procesos de aneuploidía ⁽²⁶⁵⁾. Teniendo

en cuenta la importante función de todas estas proteínas en relación al control de la segregación cromosómica y formación del huso mitótico, una represión en sus niveles de expresión podría resultar en una disfunción del ciclo en las últimas fases.

BUB-1 es una serin-treonin quinasa que está unida a los cinetocoros y presenta una función primordial en el establecimiento del punto de control en la formación del huso mitótico o SAC (*splinde assembly checkpoint*)^(120, 170) y sirve como plataforma para el reclutamiento en el cinetocoro de otras proteínas reguladoras como MAD1, MAD2A, CENPE y PLK^{(111) (293)}. La pérdida de función por mutación o ausencia de BUB-1 resulta en aneuploidía, inestabilidad cromosómica y senescencia prematura⁽²⁶⁾. Igualmente MAD1, que es codificada por *MAD1L*, también forma parte del SAC y se localiza en el centrosoma asociado a cinetocoros durante la metafase y en la zona intermedia del huso mitótico durante la anafase y la telofase⁽²³⁵⁾ inhibiendo la actividad del complejo promotor de anafase, previniendo así la degradación de efectores que favorecen la salida de mitosis y el arresto mitótico en caso de detectar cinetocoros desanclados. Su depleción desencadenaría un mal funcionamiento del SAC favoreciendo la finalización de la mitosis con errores y la aparición de células aneuploides y en consecuencia la apoptosis⁽¹³⁴⁾.

Otras proteínas que participan en la segregación cromosómica y que están muy reprimidas en nuestro experimento por el tratamiento con el A β son TLK-1 y TLK-2. Las proteínas TLKs son quinasas reguladas por fosforilaciones durante el ciclo celular y aunque se expresan de forma bastante estable a lo largo de todo el ciclo presentan un pico de expresión en S⁽²³⁴⁾. En respuestas a daño en el ADN su expresión es reprimida en fases S y G2 para evitar la finalización de ciclo con daños que no hayan podido ser reparados e implica una señalización específica mediada por ATM, NBS y CHK1⁽¹¹⁶⁾. Otra de las proteínas reprimida por A β y que está implicada en el mantenimiento de la integridad cromosómica y en la regulación de la correcta separación de los cromosomas es NEK2⁽⁷⁷⁾. Una pérdida de función de esta proteína al igual que en los casos anteriores, llevaría a una alteración en la correcta finalización del ciclo celular impidiendo la segregación de los cromosomas.

Existe una clarísima inhibición de muchos de los genes que codifican proteínas que participan en la formación del huso mitótico y en la correcta segregación cromosómica, lo que de alguna manera impide la finalización del ciclo. Esto podría generar células hijas con cargas genéticas distintas y anómalas, con aneuploidías o poliploidías, que podrían desencadenar la muerte por apoptosis.

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos van en definitiva en concordancia con muchos de los datos publicados por otros grupos de investigación. En efecto, son numerosos los trabajos que describen cómo existe una reactivación del ciclo celular en las neuronas que puede causar muerte celular y neurodegeneración^(7, 86, 178, 272, 294). Es más, algunos estudios recogen un aumento y deslocalización de numerosas proteínas de ciclo, fundamentalmente de las fases G1 y S^{(168) (182)}, en neuronas post-mitóticas localizadas en la región hipocampal de cerebros afectados por AD, entre otros ciclina D y E, CDK4 y CDC2, PCNA y algunos inhibidores de CDKs como p21 y p105^(167, 287). De la misma forma una fracción significativa de las neuronas hipocampales y piramidales de regiones especialmente afectadas en pacientes con AD presentan una replicación parcial o total del ADN, algo que no se observaba en regiones cerebrales hipocampales de cerebros que no sufren proceso de demencia⁽²⁸⁸⁾. Más aún, aquellas neuronas que han reactivado su ciclo progresan a fase S, pero tan sólo 1-2% presentan un contenido doble en ADN, habiendo completado la replicación. La mayoría de estas neuronas que entran en ciclo permanecen en fase S sin llegar a terminar⁽¹⁷⁸⁾ lo que puede sugerir que los mecanismos de control existentes entre G1/S en estas células fallan haciendo que repliquen su ADN y progresando a G2, sin embargo el punto de control en G2/M detendría el ciclo, no finalizándose de forma completa. Las células completarían la fase de síntesis, pero como la mitosis (M) no se terminaría, estas células permanecerían como células aneuploides o

tetraploides ^(98, 154). Una replicación incompleta puede contribuir por tanto a la aparición de daños en el ADN que no son reparados de forma adecuada y se acumulan disminuyendo la actividad de la maquinaria replicativa ^(186, 187). No sólo las neuronas podrían morir como consecuencia de esta re-entrada anómala en ciclo, algunos autores barajan la posibilidad de que la propia aparición de la aneuploidía y la poliploidía podría también contribuir al procesamiento amiloidogénico de la APP y a los procesos inflamatorios característicos de esta patología ⁽⁸⁶⁾. Otros autores plantean esta disfunción de ciclo como uno de los primeros eventos, que predispondrían a la neurona a otros insultos haciéndola mucho más sensible a otros eventos deletéreos ⁽²⁹⁵⁾.

Otra de las cosas que llamó nuestra atención entre los genes afectados por el A β es la represión de numerosos genes que codifican proteínas implicadas en los distintos mecanismos de reparación. Este es el caso de *NBN*, *LIG4*, *ATM*, *ATR*, *CCAR1* y *H2AFX*. La alteración de los mecanismos de reparación agravaría notablemente las anomalías derivadas de la re-entrada en ciclo. La célula presenta distintos mecanismos de reparación de daños en las hebras de ADN: Reparación por recombinación homóloga (HR) en la que los daños se reparan a partir de instrucciones de la cromátida hermana y el mecanismo *non-homologous end joining* (NHEJ), que permite la reparación de daños en el ADN incluso si no existe similitud de secuencia, previniendo el reordenamiento de los cromosomas. De forma muy llamativa cuatro proteínas que están implicadas en este último sistema de reparación, *LIG4*, *NBN*, *ATM* y *ATR* se encuentran muy reprimidas por efecto del A β . *NBN* forma parte del complejo MRN, formado por Mre-11/RAD50/*NBN*, que participa en uno de los puntos más tempranos del mecanismo de reparación NHEJ e interacciona con *ATM*, otras de las proteínas reprimidas, permitiendo el reconocimiento de roturas en ADN de doble hélice y su aproximación para su posterior reparación ⁽⁴²⁾. Este complejo contribuye activamente a la regulación del ciclo y mantiene la estabilidad de la información. *ATM* junto con *ATR* son dos proteínas quinasas que actúan como sensores de daño en el ADN. Mientras que *ATM* se activa en respuesta a rupturas en el ADN de doble hebra y alteraciones estructurales en la cromatina, *ATR* responde fundamentalmente a fallos en las horquillas replicativas ^(84, 204). Ambos forman parte del punto de control que existe en G1 y cuando existe un daño celular como consecuencia de estrés genotóxico inducen un rápido aumento de P53 además de favorecer su fosforilación y una activación de las MAP quinasas, contribuyendo bien al arresto celular o a la apoptosis ⁽²⁸⁴⁾. *ATM* también regula *CCAR1* y *H2A_x* mediante reacciones de fosforilación. Mientras *CCAR1* codifica una proteína que actúa de coactivador para P53 ⁽¹⁵⁰⁾ jugando un papel importante en el crecimiento celular y la apoptosis ⁽¹¹³⁾, *H2A_x* es una forma minoritaria de las histonas H2A que es codificada por *H2AFX* y es activada en respuesta a daño celular ayudando al reclutamiento de las cohesinas, proteínas que contribuyen al mantenimiento de las cromátidas hermanas facilitando el acceso e incorporación del complejo remodelador de la cromatina para la reparación de las roturas del ADN ^(157, 220, 284) tanto en los mecanismos de reparación por recombinación homóloga como por NHEJ ⁽¹³³⁾. *LIG4* es el gen que codifica la DNA ligasa IV, la proteína responsable de ligar las rupturas en el ADN durante el proceso de reparación NHEJ junto con su cofactor XRCC4 ⁽²⁷⁾. Su peso específico en este mecanismo de reparación es tan importante que aquellas células que pierden esta proteína presentan numerosas translocaciones cromosómicas en el caso de inducción de daños en el ADN ⁽²²⁹⁾.

Todo parece indicar que tras la exposición sostenida de las células al péptido A β existen alteraciones tanto en los mecanismos de reparación como en el ciclo celular lo que estaría generando un desbalance genético consecuencia de una replicación incompleta del ADN que llevaría a una inestabilidad genómica con reordenamientos cromosómicos y a la apoptosis por la existencia de células con daños sin reparar. Nuestros resultados se ven apoyados por estudios muy recientes realizados en pacientes afectados por AD con distintos grados de alteración cognitiva en los que se observan cómo estos presentan daños importantes en el ADN además de presentar de forma paralela alteraciones en los sistemas de reparación que están directamente relacionados

con la muerte neuronal precedente a la demencia característica de esta enfermedad ⁽³³⁾. Sería interesante diseñar y realizar experimentos para determinar si estas alteraciones en los mecanismos de reparación son una causa o una consecuencia de la toxicidad inducida por el péptido A β . Cabría plantearse si la alteración directa en los mecanismos de reparación llevaría a la muerte por una acumulación de daños en el ADN, que no son reparados tras la re-entrada en ciclo, o bien si los mecanismos de reparación tratan de reparar todos los daños producidos como consecuencia de la re-entrada en ciclo y al existir tantos, haciéndose irreparables, la célula decide inhibir los mecanismos de reparación y redirigir toda la energía para desencadenar la apoptosis.

Cuando estudiamos los genes que se encuentran alterados en su expresión para el PrP106-126 en las categorías ontológicas de ciclo celular, mitosis y transición G1/S (*Anexo III_Resultados_PrP_Reg*), encontramos de nuevo numerosas ciclinas y proteínas reguladoras de ciclo celular que se ven alteradas, sin embargo en este caso, muchas de estas proteínas que son fundamentales para la entrada y progresión en ciclo en las etapas mas iniciales se encuentran ya reprimidas. Existe una clara inhibición ya desde las primeras etapas de ciclo. Este es el caso de CDC2, CDC6 y CDK6 CCNA1 fundamentales en el control del ciclo S y G2 ^(189, 285), CCNA2 que favorece la progresión en las fases de transición G1/S y G2/S ⁽¹⁸¹⁾ y CCNH implicada en procesos de regulación transcripcional dependientes de TFII y de la ARN polimerasa constituyendo un punto de control y de unión importante entre la expresión basal de numerosos genes y las distintas fases de ciclo celular mediante su unión a otras proteínas como CDKA1 y MAT1⁽³⁾. TFDP1, también inhibida por efecto del PrP, promueve la transcripción de los genes dependiente de E2F y constituye parte del complejo de control transcripcional génico durante la fase de transición G1/S ⁽¹⁰⁾.

Al igual que para el caso del A β son numerosos los genes implicados en la formación del huso mitótico y la regulación de la segregación cromosómica y la reparación del ADN los que se ven reprimidos por efecto del PrP. Este es el caso de *CEP55*, *MAD2L1*, *BUB-1* y *MAP9*.

CEP55 juega un papel fundamental en la salida de mitosis y citocinesis reclutando a otras proteínas en los cuerpos intermedios ⁽¹⁷⁷⁾, *MAD2L1* codifica la proteína MAD2A que está implicada en el control del ensamblaje del huso mitótico (SAC) y constituye un punto de control en el caso de formación de husos mitóticos aberrantes o daño en el cinetocoro ⁽¹⁴⁷⁾ desencadenando al arresto celular mediante la detención del ciclo en la fase más temprana de la anafase evitando así la aparición de células hijas aneuploides ^(65, 111, 147, 293). MAP-9 es una proteína asociada a microtúbulos implicada en la formación del huso mitótico, la progresión en mitosis y la citocinesis, su depleción lleva a la aparición de graves defectos como la formación de husos aberrantes, retraso en la progresión de mitosis, fallo en la citoquinesis y apoptosis ⁽²¹⁹⁾. Algo similar ocurre con los genes implicados en los mecanismos de reparación que también están inhibidos. Entre otros encontramos genes implicados en los mecanismos de reparación por NEHJ y recombinación homóloga como *ATR*, *ATM*, *NBN*, *LIG4*, *SFN*, *SMC2* y *3* y *RIF1*. *SMC2* y *3* están implicadas en procesos como el mantenimiento de las estructura y dinámica cromosómica la regulación génica y la reparación del ADN ⁽¹²⁸⁾. Mientras que *SMC2* participa en la reparación de rupturas simples del ADN (SSB), *SMC3* está implicado en la reparación de rupturas de doble hebra en el ADN ⁽⁸⁸⁾. Otra proteína importante en los procesos de reparación de rupturas dobles en el ADN por recombinación homóloga y que se encuentra muy reprimida por efecto del PrP, es RIF-1 que actúa como sensor de daños en el punto de control de la fase S de ciclo y se acumula en las horquillas de replicación asociado a la heterocromatina centromérica ⁽²⁶⁹⁾.

Todo parece apuntar, al igual que en el A β , que existe una clara inhibición de los mecanismos de reparación y del ciclo celular en las células que están en contacto directo con el PrP106-126. De nuevo, cabría plantearse si

la inhibición masiva de estos genes pudiera ser una consecuencia de un daño importante en el ADN que obligara a la célula a no destinar más energía y recursos a la reparación de estos daños y si al desencadenamiento de la apoptosis, un proceso por otro lado altamente dependiente de energía (ATP), o bien, si la inhibición de los mecanismos de reparación sería una consecuencia directa de la toxicidad del PrP106-126, que llevaría al acumulo de daños irreparables que harían desencadenar en la célula el programa apoptótico. Estudios recientes muestran cómo una desregulación del ciclo puede producirse tras la estimulación con PrP106-126 en neuronas corticales humanas, mostrando niveles elevados de proteínas características de fase G1 y S pero no marcadores de M⁽¹⁵⁴⁾. Sería por tanto interesante y necesario, por otro lado, la realización de nuevos experimentos que permitieran estudiar en detalle la dirección y destino final de todos estos cambios.

Otro de los procesos que se ven alterados en ambos grupos experimentales (A β y PrP) es la proteólisis mediada por ubiquitina. El proteasoma en colaboración con un sofisticado sistema de ubiquitinación permite el marcaje selectivo y la degradación de numerosas proteínas reguladoras de vida corta que deben desaparecer en el contexto de una correcta regulación transcripcional y celular, así como de aquellas proteínas anormalmente plegadas que deben ser eliminadas de la célula, para evitar una disfunción celular⁽¹⁶³⁾. Está implicado en diversos procesos celulares como el tráfico de membranas, la función de histonas, la regulación transcripcional, la reparación del ADN y el ciclo celular^(197, 266). Dentro de los genes que se agrupan en esta categoría ontológica tanto para A β como el PrP encontramos *ANAPC10*, *BIRC3*, *CUL2*, *CUL3*, *CUL4A*, *MDM2*, *XIAP*, *UBA6/UBE1L2*, *UBE2D1*, *UBE2K*, *SAE1*, *UBA2/SAE2*.

Entre los genes alterados por ambos tratamientos encontramos varias cullinas (CUL2, 3 y 4A) que pertenecen al grupo de las E3 ubiquitina-ligasa, implicadas en la reacción enzimática secuencial necesaria para la degradación proteica mediada por proteasoma⁽¹⁶³⁾. Además de las cullinas encontramos UBE1C, UBE1L2, UBE2D1 y UBE2K que codifican proteínas que regulan el correcto funcionamiento del ciclo celular, facilitando el marcaje para la degradación de distintas proteínas reguladoras importantes en ciclo. Este es el caso de P53 que mediante un proceso de control de retroalimentación mediado por estas ubiquitinas reguladoras y MDM2 mantiene altos o bajos los niveles de expresión y proteína ante la presencia de determinadas señales estabilizadoras o de daño en el ADN y estrés oxidativo facilitando la activación o inhibición transcripcional de numerosos genes⁽⁹⁵⁾. La inhibición de estos genes implicados en la regulación de P53 junto con el daño a nivel del ADN, llevaría a una acumulación de P53 que impediría la replicación de la célula con daños gracias a la detención del ciclo en G1 e interfase. Si finalmente estos daños son extensos o irreparables unido a la evidente alteración en los mecanismos de reparación, se desencadenaría la apoptosis.

Existen numerosos estudios que muestran cómo los procesos de ubiquitinación se encuentran alterados en las áreas cerebrales más deterioradas de pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer⁽¹²³⁾ y en las prionopatías, encontrando en estas últimas, alteraciones en las funciones neuronales como consecuencia de la inhibición de las subunidades β del núcleo 26S del proteasoma tras la infección de células con extractos cerebrales infectados por PrP^{sc}^(109, 138).

Además de moléculas implicadas en la ubiquitinación encontramos sobreexpresados, tanto para el A β como para el PrP, genes que codifican proteínas implicadas en la sumoilación como SAE1 y UBA2/SAE2 implicadas en la activación dependiente de ATP de las proteínas SUMO⁽⁴⁷⁾. Recientes estudios demuestran como los procesos de sumoilación atenúan la agregación y la toxicidad celular de aquellas células que contienen expansiones de poliglutamina como la ataxina⁽¹¹⁰⁾. Aparentemente la sumoilación podría funcionar como un impedimento estérico para la formación de grandes agregados con estructuras β -laminares, previniendo el plegamiento anómalo de las proteínas. Teniendo en cuenta la naturaleza β -laminar tanto de los agregados amiloides como de los priones,

podríamos concluir cómo un aumento en la expresión de estas dos enzimas tendría un valor beneficioso en el contexto de la enfermedad de Alzheimer y las prionopatías evitándose la formación de agregados de mayor tamaño.

Otra de las rutas biológicas que se ven alteradas por efecto de la toxicidad asociada al A β y al PrP es la ruta de señalización de las gonadotropinas. A pesar de que la misma ruta se ve afectada los genes los que se ven afectados son distintos. En las células expuestas al A β encontramos alterados la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH2) y numerosos genes que codifican para numerosas proteínas implicadas en la señalización del Ca²⁺ como la adenilato ciclasa 4 (ADCY4), 6 (ADCY6), la 8 (ADCY8), la calmodulina, la proteína quinasa II dependiente de calmodulina (CAMK2B), varias fosfolipasas A21B (PLA21B), A2G2E (PLA2G2E), A2G2F (PLA2G2F), (PLA2G6), PLC, PLD1 y canales de calcio tipo L- dependientes de voltaje. Son numerosas y muy recientes las publicaciones que establecen una relación entre el sistema hormonal de liberación de las gonadotropinas y la neurodegeneración asociada al Alzheimer ^{(9)(169, 270)}. La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) juega un papel fundamental en la regulación reproductiva hormonal tanto periférica como central, pero además de estas funciones controla funciones superiores como el aprendizaje y la memoria ⁽²⁷⁰⁾, procesos por otro lado claramente alterados en la enfermedad de Alzheimer. Existen tres tipos de gonadotropinas que se expresan en vertebrados, GnRHI, GnRHII y GnRHIII. De forma llamativa GnRH2 se encuentra muy reprimida por efecto del A β . GnRHII presenta una expresión particularmente abundante en el núcleo caudado, la amígdala e hipocampo ⁽¹⁴⁴⁾, favoreciendo la transmisión sináptica mediada por receptores glutamatérgicos ⁽⁸⁵⁾ y coincidiendo además con dos de las áreas más afectadas en la enfermedad de Alzheimer. La acción de GnRHII es mediada a través del receptor para gonadotropinas GnRHR, que pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Tras la unión de GnRHII a GnRHR se generan segundos mensajeros como el diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato (IP3) vía MAP quinasas ⁽¹⁷³⁾ que lleva a la activación de la PKC mientras que el IP3 favorece la liberación del Ca²⁺ desde los reservorios intracelulares ⁽²⁷⁰⁾ y a un aumento del AMP cíclico, la activación de múltiples MAP quinasas, de GSK3 y de tirosinas quinasas como c-SRC y diacil-glicerol quinasas ⁽²⁷⁰⁾. Otra de las evidencias que ponen de manifiesto la importancia de esta ruta en esta patología es la prevalencia de la enfermedad de Alzheimer entre las mujeres que presentan la menopausia, disminuyendo ésta notablemente entre aquellas mujeres que mantienen altos niveles de estrógenos después de la menopausia y el eje HPG funcional ⁽¹⁵⁹⁾. Más aún en la actualidad se están proponiendo la utilización de análogos de GnRH como terapia en las enfermedades neurodegenerativas ⁽²⁷⁰⁾. Al presentar muy inhibida GnRHII, todos los procesos dependientes de la unión de este ligando al receptor GnRHR, como la plasticidad neuronal, el aprendizaje y la memoria, podrían verse directamente alterados. De nuestros resultados podemos inferir igualmente que existe una clara alteración de los mecanismos de señalización mediados por calcio, viéndose afectadas varias isoformas de la Adenilato ciclasa (AC), la CAMKII la fosfolipasa C y D. Son numerosas las publicaciones que describen una relación directa entre la actividad de la adenilato ciclasa y la enfermedad de Alzheimer. Los niveles de AMP cíclico se ven alterados en distintas áreas cerebrales de pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer ⁽³⁷⁾. Las alteraciones en la memoria podrían surgir en parte como una consecuencia de la alteración de la plasticidad sináptica a corto plazo dependiente de AMP cíclico y calcio así como de la alteración de los procesos de potenciación a largo plazo asociada a una disminución en la actividad de esta enzima ⁽¹⁸⁸⁾. Mas aún, ha sido descrito cómo la aplicación directa de A β 25-35 sobre neuronas hipocámpales produce cambios en los procesos de potenciación a largo plazo mediados por la adenilato ciclasa, lo que favorece la alteración de la homeostasis del calcio vía PKA/CREB ⁽¹⁵⁾. Otros trabajos describen cómo las alteraciones en la neurotransmisión en pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer se debe, además de la alteración de la adenilato ciclasa, a la de la hidrólisis de los fosfoinositidos mediada por la PLC

^(36, 67). Esto es algo que puede verse apoyado por nuestros resultados ya que el gen que codifica para la PLC se encuentra muy inhibido por A β . Así la depleción de los niveles de expresión para este gen supondría la ausencia de segundos mensajeros, viéndose alterada toda la señalización secundaria dependiente de esta proteína. Otro de los genes implicado en la señalización del calcio que está claramente alterado es el que codifica para los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCCs). Cuando se emplean inhibidores farmacológicos para estos canales existe una represión transcripcional que produce alteraciones sinápticas que pueden resultar en una alteración de los procesos de plasticidad y memoria ⁽⁶²⁾. Una represión en la expresión de estos canales podría estar indicando la existencia de una alteración de la señalización del calcio y en consecuencia de los procesos sinápticos implicados en la memoria, ya que estos canales son una de las principales fuentes de entrada de Ca²⁺ en la célula ⁽¹⁴⁶⁾. Mas aún, ha sido descrito cómo la aplicación de A β 25-35 en neuronas hipocámpales de rata tipo CA1 altera la homeostasis intracelular del calcio mediante la modulación de la actividad de otros canales dependientes de voltaje tipo L y T ⁽¹⁴⁶⁾.

Otros dos genes muy alterados en su expresión por efecto del A β son *ATF4* y *GRB2*. De forma llamativa *ATF4* se une a la región reguladora del gen que codifica la presenilina-1 uno de los principales genes que participan en el procesamiento del APP ⁽¹⁷⁴⁾ y *GRB2* es una proteína que junto con SOS-1 constituyen uno de los principales componentes inductores de transducción de señal en la membrana plasmática, favoreciendo la expresión de diversas ciclinas e inhibidores de ciclo. Existe estudios que muestran cómo existe alteraciones tanto de *GRB2* como de su ligando en cerebros de pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer en relación a los pacientes control ⁽¹⁷⁴⁾

Al igual que para el caso del A β existe una alteración de la señalización mediada por gonadotropinas en las células expuestas al PrP106-126, aunque los genes afectados son diferentes. Encontramos entre los genes mas alterados, los canales de calcio tipo L-dependientes de voltaje codificados por *CACNA1D*, la fosfolipasa A2 y la fosfolipasa C, la protein quinasa C y SOS. No existen estudios que describan la existencia de alteraciones de esta ruta en pacientes o animales afectados por esta patología. Sin embargo, si se ha observado cómo la proteína PrP está implicada en el metabolismo del calcio, evocando elevaciones de los niveles de calcio en neuronas hipotalámicas gonadotrópicas ⁽¹²¹⁾ y también existe una alteración del metabolismo del calcio en células infectadas con priones, disminuyendo los niveles de calcio en el retículo endoplásmico, contribuyendo a aparición de la muerte celular inducida por estrés en retículo endoplásmico y mitocondria ^(68, 259).

Nuestros resultados nos permiten inferir que existe una clara alteración de la señalización dependiente del calcio asociada a la toxicidad de ambos péptidos que podría afectar a los procesos de plasticidad sináptica tan importante en el desarrollo de los procesos de la memoria.

A pesar de las obvias diferencias que existen entre estas patologías y de que las proteínas implicadas son diferentes, son numerosos los mecanismos moleculares equivalentes que acontecen en ambos procesos patogénicos. Como hemos podido comprobar en nuestros resultados, aunque efectivamente son mas las diferencias, existen coincidencias en algunas rutas de señalización que se ven alteradas como consecuencia de la toxicidad asociada al contacto directo de las células con los péptidos A β y PrP, viéndose afectados fundamentalmente, el ciclo celular, los sistemas de reparación, el catabolismo proteico mediado por ubiquitina, la ruta de las gonadotropinas y el metabolismo del calcio. Sería interesante plantear experimentos nuevos para determinar la dirección de todos estos cambios y su resultado final en el destino de la célula. A pesar de que este estudio se planteó hace ya algunos años, cuando la tecnología de los *microarrays* estaba despegando, los

resultados que derivan del mismo presentan vigencia aún hoy, pues muestran múltiples cambios generados como consecuencia de la toxicidad derivada del contacto directo tanto del A β como del PrP con las células y en ausencia de otros estímulos como los provenientes de la activación de la glia. Esto va en sintonía con numerosos estudios más actuales, que ponen de manifiesto un papel directo de los péptidos amiloidogénicos sobre las células que están en contacto con ellos, tanto en sus formas oligoméricas como los agregados β -laminares, constituyendo el origen de la toxicidad tanto en la enfermedad de Alzheimer ^(54, 106, 118) como en las priponopatías. ^(69, 222). La gran cantidad de información que hemos obtenido de estos experimentos por tanto puede servir de soporte y comienzo para el planteamiento de nuevas hipótesis de trabajo que permitan establecer relaciones biológicas no evidentes hasta ahora entre distintas rutas y moléculas implicadas en los procesos neurotóxicos asociados a los agregados amiloidogénicos tan característicos tanto de la enfermedad de Alzheimer como en las prionopatías, constituyendo la base para nuevas líneas de actuación en investigación futuras.

Sería interesante desarrollar experimentos más específicos (proteómica, citometría de flujo y ARN de interferencia) que permitieran abordar y profundizar en las nuevas hipótesis de trabajo surgidas como resultado del análisis de estos *microarrays*, con el fin de conocer en profundidad los mecanismos de acción de ambos péptidos en el contexto tanto de la enfermedad de Alzheimer como de las prionopatías.

Igualmente, también sería necesario plantear ensayos *in vivo*, con alguno de los modelos animales disponibles para cada una de las patologías, con el fin de complementar estos resultados y determinar si estas alteraciones moleculares y biológicas descritas *in vitro* se producen de la misma forma modelos que reproducen los síntomas y las alteraciones neuropatológicas asociadas a ambas patologías.

6. CONCLUSIONES

1. Los péptidos amiloidogénicos A β 25-35 y PrP106-126 son capaces de inducir la muerte de las neuronas en ausencia de la glía.
2. Existe una gran mayoría de procesos biológicos, moleculares y de transducción de señal específicamente afectados por cada uno de los péptidos. Sin embargo, también existen algunos alterados de forma común que podrían suponer una vía de actuación terapéutica, incluso estudiarse en patologías similares que también cursan con agregados proteicos como el Huntington, Parkinson y diversas Ataxias.
3. El ciclo celular, la mitosis, la segregación cromosómica y los mecanismos de reparación están claramente alterados por efecto tanto del A β 25-35 como del PrP106-126.
4. Los procesos de ubiquitinación están igualmente alterados por efecto tanto del A β 25-35 como del PrP106-126.
5. La ruta de señalización de las gonadotropinas y el metabolismo del calcio están alterados por efecto tanto del A β 25-35 como del PrP106-126.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abate, C., D. Luk, and T. Curran, *Mol Cell Biol*, 1991. 11(7).Transcriptional regulation by Fos and Jun in vitro: interaction among multiple activator and regulatory domains. p. 3624-32.
2. Agostinho, P. and C.R. Oliveira, *Eur J Neurosci*, 2003. 17(6).Involvement of calcineurin in the neurotoxic effects induced by amyloid-beta and prion peptides. p. 1189-96.
3. Akoulitchiev, S., S. Chuikov, and D. Reinberg, *Nature*, 2000. 407(6800).TFIIH is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. p. 102-6.
4. Al-Shahrour, F., P. Minguez, J.M. Vaquerizas, L. Conde, and J. Dopazo, *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(Web Server issue).BABELOMICS: a suite of web tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments. p. W460-4.
5. Al-Shahrour, F., P. Minguez, J. Tarraga, D. Montaner, E. Alloza, J.M. Vaquerizas, L. Conde, C. Blaschke, J. Vera, and J. Dopazo, *Nucleic Acids Res*, 2006. 34(Web Server issue).BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. p. W472-6.
6. Alvarez, A., R. Toro, A. Caceres, and R.B. Maccioni, *FEBS Lett*, 1999. 459(3).Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. p. 421-6.
7. Arendt, T., *J Neural Transm Suppl*, 2002(62).Dysregulation of neuronal differentiation and cell cycle control in Alzheimer's disease. p. 77-85.
8. Atwood, C.S., M.E. Obrenovich, T. Liu, H. Chan, G. Perry, M.A. Smith, and R.N. Martins, *Brain Res Brain Res Rev*, 2003. 43(1).Amyloid-beta: a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid-beta. p. 1-16.
9. Atwood, C.S., S.V. Meethal, T. Liu, A.C. Wilson, M. Gallego, M.A. Smith, and R.L. Bowen, *J Neuropathol Exp Neurol*, 2005. 64(2).Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis with menopause and andropause promotes neurodegenerative senescence. p. 93-103.
10. Bandara, L.R. and N.B. La Thangue, *Nature*, 1991. 351(6326).Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. p. 494-7.
11. Bate, C., R. Veerhuis, P. Eikelenboom, and A. Williams, *Neuroreport*, 2003. 14(16).Neurons treated with cyclo-oxygenase-1 inhibitors are resistant to amyloid-beta1-42. p. 2099-103.
12. Bedecs, K., *Methods Mol Biol*, 2008. 459.Cell culture models to unravel prion protein function and aberrancies in prion diseases. p. 1-20.
13. Behl, C., J.B. Davis, R. Lesley, and D. Schubert, *Cell*, 1994. 77(6).Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. p. 817-27.
14. Benjamini, Y.a.H., Y., *J Royal Stat Soc B*, 1995(57).Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. p. 289-300.
15. Bisel, B.E., K.M. Henkins, and K.D. Parfitt, *Ann N Y Acad Sci*, 2007. 1097.Alzheimer amyloid beta-peptide A-beta25-35 blocks adenylate cyclase-mediated forms of hippocampal long-term potentiation. p. 58-63.
16. Blasko, I., M. Stampfer-Kountchev, P. Robatscher, R. Veerhuis, P. Eikelenboom, and B. Grubeck-Loebenstein, *Aging Cell*, 2004. 3(4).How chronic inflammation can affect the brain and support the development of Alzheimer's disease in old age: the role of microglia and astrocytes. p. 169-76.
17. Bonda, D.J., H.P. Lee, W. Kudo, X. Zhu, M.A. Smith, and H.G. Lee, *Expert Rev Mol Med*, 2010. 12.Pathological implications of cell cycle re-entry in Alzheimer disease. p. e19.
18. Booij, B.B., T. Lindahl, P. Wetterberg, N.V. Skaane, S. Saebo, G. Feten, P.D. Rye, L.I. Kristiansen, N. Hagen, M. Jensen, K. Bardsen, B. Winblad, P. Sharma, and A. Lonneborg, *J Alzheimers Dis*, 2011. 23(1).A gene expression pattern in blood for the early detection of Alzheimer's disease. p. 109-19.
19. Boonen, R.A., P. van Tijn, and D. Zivkovic, *Ageing Res Rev*, 2009. 8(2).Wnt signaling in Alzheimer's disease: up or down, that is the question. p. 71-82.
20. Borchelt, D.R., M. Scott, A. Taraboulos, N. Stahl, and S.B. Prusiner, *J Cell Biol*, 1990. 110(3).Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. p. 743-52.
21. Borlado, L.R. and J. Mendez, *Carcinogenesis*, 2008. 29(2).CDC6: from DNA replication to cell cycle checkpoints and oncogenesis. p. 237-43.
22. Bossy-Wetzell, E., R. Schwarzenbacher, and S.A. Lipton, *Nat Med*, 2004. 10 Suppl.Molecular pathways to neurodegeneration. p. S2-9.
23. Brown, D.R., *Mol Cell Neurosci*, 2000. 15(1).Prion protein peptides: optimal toxicity and peptide blockade of toxicity. p. 66-78.

24. Brown, D.R., *Microsc Res Tech*, 2001. 54(2).Microglia and prion disease. p. 71-80.
25. Bush, A.I., *Curr Opin Chem Biol*, 2000. 4(2).Metals and neuroscience. p. 184-91.
26. Cahill, D.P., C. Lengauer, J. Yu, G.J. Riggins, J.K. Willson, S.D. Markowitz, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Nature*, 1998. 392(6673).Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. p. 300-3.
27. Callebaut, I., L. Malivert, A. Fischer, J.P. Mornon, P. Revy, and J.P. de Villartay, *J Biol Chem*, 2006. 281(20).Cernunnos interacts with the XRCC4 x DNA-ligase IV complex and is homologous to the yeast nonhomologous end-joining factor Nej1. p. 13857-60.
28. Canzoniero, L.M., A. Adornetto, A. Secondo, S. Magi, C. Dell'aversano, A. Scorziello, S. Amoroso, and G. Di Renzo, *J Neurosci Res*, 2006. 84(3).Involvement of the nitric oxide/protein kinase G pathway in polychlorinated biphenyl-induced cell death in SH-SY 5Y neuroblastoma cells. p. 692-7.
29. Caughey, B., G.J. Raymond, D. Ernst, and R.E. Race, *J Virol*, 1991. 65(12).N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. p. 6597-603.
30. Ciesielski-Treska, J., N.J. Grant, G. Ulrich, M. Corrotte, Y. Bailly, A.M. Haeberle, S. Chasserot-Golaz, and M.F. Bader, *Glia*, 2004. 46(2).Fibrillar prion peptide (106-126) and scrapie prion protein hamper phagocytosis in microglia. p. 101-15.
31. Citron, M., T. Oltersdorf, C. Haass, L. McConlogue, A.Y. Hung, P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, I. Lieberburg, and D.J. Selkoe, *Nature*, 1992. 360(6405).Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. p. 672-4.
32. Clementi, M.E., S. Marini, M. Coletta, F. Orsini, B. Giardina, and F. Misiti, *FEBS Lett*, 2005. 579(13). Abeta(31-35) and Abeta(25-35) fragments of amyloid beta-protein induce cellular death through apoptotic signals: Role of the redox state of methionine-35. p. 2913-8.
33. Coppede, F. and L. Migliore, *J Alzheimers Dis*, 2010. 20(4).Evidence linking genetics, environment, and epigenetics to impaired DNA repair in Alzheimer's disease. p. 953-66.
34. Coulson, E.J., *J Neurochem*, 2006. 98(3).Does the p75 neurotrophin receptor mediate Abeta-induced toxicity in Alzheimer's disease? p. 654-60.
35. Coulson, E.J., K. Paliga, K. Beyreuther, and C.L. Masters, *Neurochem Int*, 2000. 36(3).What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. p. 175-84.
36. Cowburn, R.F., C. O'Neill, W.L. Bonkale, T.G. Ohm, and J. Fastbom, *Biochem Soc Symp*, 2001(67). Receptor-G-protein signalling in Alzheimer's disease. p. 163-75.
37. Cowburn, R.F., C. O'Neill, R. Ravid, I. Alafuzoff, B. Winblad, and C.J. Fowler, *J Neurochem*, 1992. 58(4).Adenylyl cyclase activity in postmortem human brain: evidence of altered G protein mediation in Alzheimer's disease. p. 1409-19.
38. Crozet, C., F. Beranger, and S. Lehmann, *Vet Res*, 2008. 39(4).Cellular pathogenesis in prion diseases. p. 44.
39. Cruz, J.C., H.C. Tseng, J.A. Goldman, H. Shih, and L.H. Tsai, *Neuron*, 2003. 40(3).Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. p. 471-83.
40. Cui, J.G., J.M. Hill, Y. Zhao, and W.J. Lukiw, *Neuroreport*, 2007. 18(2).Expression of inflammatory genes in the primary visual cortex of late-stage Alzheimer's disease. p. 115-9.
41. Chan, T.A., H. Hermeking, C. Lengauer, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Nature*, 1999. 401(6753).14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. p. 616-20.
42. Chen, L., K. Trujillo, W. Ramos, P. Sung, and A.E. Tomkinson, *Mol Cell*, 2001. 8(5).Promotion of Dnl4-catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes. p. 1105-15.
43. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Anal Biochem*, 1987. 162(1).Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. p. 156-9.
44. Churchill, G.A., *Nat Genet*, 2002. 32 Suppl.Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. p. 490-5.
45. De Gioia, L., C. Selvaggini, E. Ghibaudi, L. Diomede, O. Bugiani, G. Forloni, F. Tagliavini, and M. Salmona, *J Biol Chem*, 1994. 269(11).Conformational polymorphism of the amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein. p. 7859-62.
46. DeArmond, S.J., *Neurochem Res*, 2004. 29(11).Discovering the mechanisms of neurodegeneration in prion diseases. p. 1979-98.
47. Desterro, J.M., M.S. Rodriguez, G.D. Kemp, and R.T. Hay, *J Biol Chem*, 1999. 274(15).Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. p. 10618-24.

48. Diana, A., C. Eriksson, B. Winblad, and M. Schultzberg, *Int J Dev Neurosci*, 2000. 18(2-3).IL-1beta and ICE mRNA are not altered upon beta-amyloid(25-35) induced neurotoxicity in human neuroblastoma cells. p. 237-46.
49. Drewes, G., A. Ebner, U. Preuss, E.M. Mandelkow, and E. Mandelkow, *Cell*, 1997. 89(2).MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. p. 297-308.
50. Drury, L.S., G. Perkins, and J.F. Diffley, *Embo J*, 1997. 16(19).The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast. p. 5966-76.
51. Ducray, F., J. Honnorat, and J. Lachuer, *Rev Neurol (Paris)*, 2007. 163(4).[DNA microarray technology: principles and applications to the study of neurological disorders]. p. 409-20.
52. Dupiereux, I., W. Zorzi, W. Rachidi, D. Zorzi, O. Pierard, B. Lhereux, E. Heinen, and B. Elmoualij, *J Neurosci Res*, 2006. 84(3).Study on the toxic mechanism of prion protein peptide 106-126 in neuronal and non neuronal cells. p. 637-46.
53. Dupuis, N.F., C. Wu, J.E. Shea, and M.T. Bowers, *J Am Chem Soc*, 2009. 131(51).Human islet amyloid polypeptide monomers form ordered beta-hairpins: a possible direct amyloidogenic precursor. p. 18283-92.
54. Ebenezer, P.J., A.M. Weidner, H. Levine, W.R. Markesbery, M.P. Murphy, L. Zhang, K. Dasuri, S.O. Fernandez-Kim, A.J. Bruce-Keller, E. Gavilan, and J.N. Keller, *J Alzheimers Dis*, 2010.Neuron Specific Toxicity of Oligomeric Amyloid-beta: Implications for JUN-Kinase and Oxidative Stress. p.
55. Ebinu, J.O. and B.A. Yankner, *Neuron*, 2002. 34(4).A RIP tide in neuronal signal transduction. p. 499-502.
56. Eghiaian, F., J. Grosclaude, S. Lesceu, P. Debey, B. Doublet, E. Treguer, H. Rezaei, and M. Knossow, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(28).Insight into the PrPC-->PrPSc conversion from the structures of antibody-bound ovine prion scrapie-susceptibility variants. p. 10254-9.
57. Eikelenboom, P., E. van Exel, J.J. Hoozemans, R. Veerhuis, A.J. Rozemuller, and W.A. van Gool, *Neurodegener Dis*, 2010. 7(1-3).Neuroinflammation - an early event in both the history and pathogenesis of Alzheimer's disease. p. 38-41.
58. Eikelenboom, P., C. Bate, W.A. Van Gool, J.J. Hoozemans, J.M. Rozemuller, R. Veerhuis, and A. Williams, *Glia*, 2002. 40(2).Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease. p. 232-9.
59. Eisen, M.B., P.T. Spellman, P.O. Brown, and D. Botstein, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(25).Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. p. 14863-8.
60. Elledge, S.J. and M.R. Spottswood, *Embo J*, 1991. 10(9).A new human p34 protein kinase, CDK2, identified by complementation of a cdc28 mutation in *Saccharomyces cerevisiae*, is a homolog of *Xenopus* Eg1. p. 2653-9.
61. Enserink, J.M. and R.D. Kolodner, *Cell Div*, 2010. 5.An overview of Cdk1-controlled targets and processes. p. 11.
62. Espana, J., J. Valero, A.J. Minano-Molina, R. Masgrau, E. Martin, C. Guardia-Laguarta, A. Lleo, L. Gimenez-Llort, J. Rodriguez-Alvarez, and C.A. Saura, *J Neurosci*, 2010. 30(28).beta-Amyloid disrupts activity-dependent gene transcription required for memory through the CREB coactivator CRTC1. p. 9402-10.
63. Evans, D.A., H.H. Funkenstein, M.S. Albert, P.A. Scherr, N.R. Cook, M.J. Chown, L.E. Hebert, C.H. Hennekens, and J.O. Taylor, *Jama*, 1989. 262(18).Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. p. 2551-6.
64. Evin, G., A. Zhu, R.M. Holsinger, C.L. Masters, and Q.X. Li, *J Neurosci Res*, 2003. 74(3).Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein in brain and platelets. p. 386-92.
65. Fang, G., H. Yu, and M.W. Kirschner, *Genes Dev*, 1998. 12(12).The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. p. 1871-83.
66. Faucheux, B.A., N. Privat, J.P. Brandel, V. Sazdovitch, J.L. Laplanche, C.A. Maurage, J.J. Hauw, and S. Haik, *J Neuropathol Exp Neurol*, 2009. 68(8).Loss of cerebellar granule neurons is associated with punctate but not with large focal deposits of prion protein in Creutzfeldt-Jakob disease. p. 892-901.
67. Fernhall, B. and M. Otterstetter, *J Appl Physiol*, 2003. 94(6).Attenuated responses to sympathoexcitation in individuals with Down syndrome. p. 2158-65.
68. Ferreira, E., C.R. Oliveira, and C.M. Pereira, *Neurobiol Dis*, 2008. 30(3).The release of calcium from the endoplasmic reticulum induced by amyloid-beta and prion peptides activates the mitochondrial apoptotic

pathway. p. 331-42.

69. Ferreira, E., A. Eufrazio, C. Pereira, C.R. Oliveira, and A.C. Rego, *J Alzheimers Dis*, 2007. 12(3).Bcl-2 overexpression protects against amyloid-beta and prion toxicity in GT1-7 neural cells. p. 223-8.
70. Ferri, C.P., R. Sousa, A. E., S. W.S., and M. Honyashiki, *Informe mundial sobre el Alzheimer 2009*, in *Resumen ejecutivo del informe mundial sobre el Alzheimer 2009*, M. Prince and J. Jackson, Editors. 2009, Alzheimer's disease International. The International Federation of Alzheimer Disease and related disorders.
71. Fife, A., I. Sponne, V. Koziel, B. Kriem, F.T. Yen Potin, B.E. Bihain, J.L. Olivier, T. Oster, and T. Pillot, *J Biol Chem*, 2006. 281(1).Microtubule-associated protein MAP1A, MAP1B, and MAP2 proteolysis during soluble amyloid beta-peptide-induced neuronal apoptosis. Synergistic involvement of calpain and caspase-3. p. 229-40.
72. Fodor, S.P., R.P. Rava, X.C. Huang, A.C. Pease, C.P. Holmes, and C.L. Adams, *Nature*, 1993. 364(6437). Multiplexed biochemical assays with biological chips. p. 555-6.
73. Forloni, G., *Funct Neurol*, 1993. 8(3).beta-Amyloid neurotoxicity. p. 211-25.
74. Forloni, G., N. Angeretti, R. Chiesa, E. Monzani, M. Salmona, O. Bugiani, and F. Tagliavini, *Nature*, 1993. 362(6420).Neurotoxicity of a prion protein fragment. p. 543-6.
75. Forloni, G., R. Chiesa, S. Smirardo, L. Verga, M. Salmona, F. Tagliavini, and N. Angeretti, *Neuroreport*, 1993. 4(5).Apoptosis mediated neurotoxicity induced by chronic application of beta amyloid fragment 25-35. p. 523-6.
76. Freir, D.B., R. Fedriani, D. Scully, I.M. Smith, D.J. Selkoe, D.M. Walsh, and C.M. Regan, *Neurobiol Aging*, 2010.Abeta oligomers inhibit synapse remodelling necessary for memory consolidation. p.
77. Fry, A.M., P. Meraldi, and E.A. Nigg, *Embo J*, 1998. 17(2).A centrosomal function for the human Nek2 protein kinase, a member of the NIMA family of cell cycle regulators. p. 470-81.
78. Gatta, V., D. Drago, K. Fincati, M.T. Valenti, L. Dalle Carbonare, S.L. Sensi, and P. Zatta, *PLoS One*, 2011. 6(1).Microarray analysis on human neuroblastoma cells exposed to aluminum, beta(1-42)-amyloid or the beta(1-42)-amyloid aluminum complex. p. e15965.
79. Giaccone, G., M. Mangieri, R. Capobianco, L. Limido, J.J. Hauw, S. Haik, P. Fociani, O. Bugiani, and F. Tagliavini, *Neurobiol Aging*, 2008. 29(12).Tauopathy in human and experimental variant Creutzfeldt-Jakob disease. p. 1864-73.
80. Ginsberg, S.D., S. Che, S.E. Counts, and E.J. Mufson, *NeuroRx*, 2006. 3(3).Single cell gene expression profiling in Alzheimer's disease. p. 302-18.
81. Girard, F., U. Strausfeld, A. Fernandez, and N.J. Lamb, *Cell*, 1991. 67(6).Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. p. 1169-79.
82. Giunta, S., M.B. Valli, R. Galeazzi, P. Fattoretti, E.H. Corder, and L. Galeazzi, *Clin Biochem*, 2005. 38(12). Transthyretin inhibition of amyloid beta aggregation and toxicity. p. 1112-9.
83. Glenner, G.G., C.W. Wong, V. Quaranta, and E.D. Eanes, *Appl Pathol*, 1984. 2(6).The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. p. 357-69.
84. Goodarzi, A.A., W.D. Block, and S.P. Lees-Miller, *Prog Cell Cycle Res*, 2003. 5.The role of ATM and ATR in DNA damage-induced cell cycle control. p. 393-411.
85. Gore, A.C., B.M. Windsor-Engnell, and E. Terasawa, *Endocrinology*, 2004. 145(10).Menopausal increases in pulsatile gonadotropin-releasing hormone release in a nonhuman primate (*Macaca mulatta*). p. 4653-9.
86. Granic, A., J. Padmanabhan, M. Norden, and H. Potter, *Mol Biol Cell*, 2010. 21(4).Alzheimer Abeta peptide induces chromosome mis-segregation and aneuploidy, including trisomy 21: requirement for tau and APP. p. 511-20.
87. Grathwohl, S.A., R.E. Kalin, T. Bolmont, S. Prokop, G. Winkelmann, S.A. Kaeser, J. Odenthal, R. Radde, T. Eldh, S. Gandy, A. Aguzzi, M. Staufenbiel, P.M. Mathews, H. Wolburg, F.L. Heppner, and M. Jucker, *Nat Neurosci*, 2009. 12(11).Formation and maintenance of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques in the absence of microglia. p. 1361-3.
88. Griesse, J.J., G. Witte, and K.P. Hopfner, *Nucleic Acids Res*, 2010. 38(10).Structure and DNA binding activity of the mouse condensin hinge domain highlight common and diverse features of SMC proteins. p. 3454-65.
89. Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y.C. Tung, M. Quinlan, H.M. Wisniewski, and L.I. Binder, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. 83(13).Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. p. 4913-7.

90. Gunther, E.C. and S.M. Strittmatter, *J Mol Med*, 2009. beta-amyloid oligomers and cellular prion protein in Alzheimer's disease. p.
91. Haass, C., *Embo J*, 2004. 23(3). Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. p. 483-8.
92. Haass, C., A.Y. Hung, M.G. Schlossmacher, D.B. Teplow, and D.J. Selkoe, *J Biol Chem*, 1993. 268(5). beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. p. 3021-4.
93. Haass, C., M.G. Schlossmacher, A.Y. Hung, C. Vigo-Pelfrey, A. Mellon, B.L. Ostaszewski, I. Lieberburg, E.H. Koo, D. Schenk, D.B. Teplow, and et al., *Nature*, 1992. 359(6393). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. p. 322-5.
94. Hampel, H. and Y. Shen, *Scand J Clin Lab Invest*, 2009. 69(1). Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1) as a biological candidate marker of Alzheimer's disease. p. 8-12.
95. Han, E.S., F.L. Muller, V.I. Perez, W. Qi, H. Liang, L. Xi, C. Fu, E. Doyle, M. Hickey, J. Cornell, C.J. Epstein, L.J. Roberts, H. Van Remmen, and A. Richardson, *Physiol Genomics*, 2008. 34(1). The in vivo gene expression signature of oxidative stress. p. 112-26.
96. Hensley, K., J.M. Carney, M.P. Mattson, M. Aksenova, M. Harris, J.F. Wu, R.A. Floyd, and D.A. Butterfield, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(8). A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. p. 3270-4.
97. Hermeking, H., C. Lengauer, K. Polyak, T.C. He, L. Zhang, S. Thiagalingam, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Mol Cell*, 1997. 1(1). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. p. 3-11.
98. Herrup, K. and T. Arendt, *J Alzheimers Dis*, 2002. 4(3). Re-expression of cell cycle proteins induces neuronal cell death during Alzheimer's disease. p. 243-7.
99. Higgins, J., C. Midgley, A.M. Bergh, S.M. Bell, J.M. Askham, E. Roberts, R.K. Binns, S.M. Sharif, C. Bennett, D.M. Glover, C.G. Woods, E.E. Morrison, and J. Bond, *BMC Cell Biol*, 2010. 11. Human ASPM participates in spindle organisation, spindle orientation and cytokinesis. p. 85.
100. Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson, *Biotechnology (N Y)*, 1993. 11(9). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. p. 1026-30.
101. Hoerndli, F.J., M. Toigo, A. Schild, J. Gotz, and P.J. Day, *Anal Biochem*, 2004. 335(1). Reference genes identified in SH-SY5Y cells using custom-made gene arrays with validation by quantitative polymerase chain reaction. p. 30-41.
102. Hope, J., *Curr Biol*, 1999. 9(18). Prions. p. R673-4.
103. Howlett, D.R., K.H. Jennings, D.C. Lee, M.S. Clark, F. Brown, R. Wetzel, S.J. Wood, P. Camilleri, and G.W. Roberts, *Neurodegeneration*, 1995. 4(1). Aggregation state and neurotoxic properties of Alzheimer beta-amyloid peptide. p. 23-32.
104. Hu, W., B. Kieseier, E. Frohman, T.N. Eagar, R.N. Rosenberg, H.P. Hartung, and O. Stuve, *J Neurol Sci*, 2008. 264(1-2). Prion proteins: physiological functions and role in neurological disorders. p. 1-8.
105. Hughes, E., R.M. Burke, and A.J. Doig, *J Biol Chem*, 2000. 275(33). Inhibition of toxicity in the beta-amyloid peptide fragment beta -(25-35) using N-methylated derivatives: a general strategy to prevent amyloid formation. p. 25109-15.
106. Ill-Raga, G., E. Ramos-Fernandez, F.X. Guix, M. Tajés, M. Bosch, E. Palomer, J. Godoy, S. Belmar, W. Cerpa, J.W. Simpkins, N.C. Inestrosa And, and F.J. Munoz, *J Alzheimers Dis*, 2010. Amyloid-beta Peptide Fibrils Induce Nitro-Oxidative Stress in Neuronal Cells. p.
107. Imahori, K. and T. Uchida, *J Biochem (Tokyo)*, 1997. 121(2). Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease. p. 179-88.
108. Ishiguro, K., M. Takamatsu, K. Tomizawa, A. Omori, M. Takahashi, M. Arioka, T. Uchida, and K. Imahori, *J Biol Chem*, 1992. 267(15). Tau protein kinase I converts normal tau protein into A68-like component of paired helical filaments. p. 10897-901.
109. Jackson, G.S., L.L. Hosszu, A. Power, A.F. Hill, J. Kenney, H. Saibil, C.J. Craven, J.P. Waltho, A.R. Clarke, and J. Collinge, *Science*, 1999. 283(5409). Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. p. 1935-7.
110. Janer, A., A. Werner, J. Takahashi-Fujigasaki, A. Daret, H. Fujigasaki, K. Takada, C. Duyckaerts, A. Brice, A. Dejean, and A. Sittler, *Hum Mol Genet*, 2010. 19(1). SUMOylation attenuates the aggregation propensity and cellular toxicity of the polyglutamine expanded ataxin-7. p. 181-95.
111. Jang, Y.J., J.H. Ji, Y.C. Choi, C.J. Ryu, and S.Y. Ko, *J Biol Chem*, 2007. 282(4). Regulation of Polo-like kinase 1 by DNA damage in mitosis. Inhibition of mitotic PLK-1 by protein phosphatase 2A. p. 2473-82.

112. Jeffrey, M., C.M. Goodsir, M.E. Bruce, P.A. McBride, and J.R. Fraser, *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1997. 23(2).In vivo toxicity of prion protein in murine scrapie: ultrastructural and immunogold studies. p. 93-101.
113. Jiang, Y., V.T. Puliappadamba, L. Zhang, W. Wu, A. Wali, M.B. Yaffe, J.A. Fontana, and A.K. Rishi, *J Mol Signal*, 2010. 5.A novel mechanism of cell growth regulation by Cell Cycle and Apoptosis Regulatory Protein (CARP)-1. p. 7.
114. Jin, S., L. Mazzacurati, X. Zhu, T. Tong, Y. Song, S. Shujuan, K.L. Petrik, B. Rajasekaran, M. Wu, and Q. Zhan, *Oncogene*, 2003. 22(52).Gadd45a contributes to p53 stabilization in response to DNA damage. p. 8536-40.
115. Jobling, M.F., L.R. Stewart, A.R. White, C. McLean, A. Friedhuber, F. Maher, K. Beyreuther, C.L. Masters, C.J. Barrow, S.J. Collins, and R. Cappai, *J Neurochem*, 1999. 73(4).The hydrophobic core sequence modulates the neurotoxic and secondary structure properties of the prion peptide 106-126. p. 1557-65.
116. Jones, M., 2010.TOUSLED LIKE KINASES:PHOSPHORYLATION AND FUNCTION DURING THE CELL CYCLE. p.
117. Jope, R.S. and G.V. Johnson, *Trends Biochem Sci*, 2004. 29(2).The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. p. 95-102.
118. Kagan, B.L. and J. Thundimadathil, *Adv Exp Med Biol*, 2010. 677.Amyloid peptide pores and the beta sheet conformation. p. 150-67.
119. Kamal, A., A. Almenar-Queralt, J.F. LeBlanc, E.A. Roberts, and L.S. Goldstein, *Nature*, 2001. 414(6864). Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. p. 643-8.
120. Kang, J., M. Yang, B. Li, W. Qi, C. Zhang, K.M. Shokat, D.R. Tomchick, M. Machius, and H. Yu, *Mol Cell*, 2008. 32(3).Structure and substrate recruitment of the human spindle checkpoint kinase Bub1. p. 394-405.
121. Kawahara, M., Y. Kuroda, N. Arispe, and E. Rojas, *J Biol Chem*, 2000. 275(19).Alzheimer's beta-amyloid, human islet amylin, and prion protein fragment evoke intracellular free calcium elevations by a common mechanism in a hypothalamic GnRH neuronal cell line. p. 14077-83.
122. Kawaji, T., Y. Ando, E. Ando, O. Sandgren, O.B. Suhr, and H. Tanihara, *Amyloid*, 2010. 17(3-4). Transthyretin-related vitreous amyloidosis in different endemic areas. p. 105-8.
123. Keller, J.N., K.B. Hanni, and W.R. Markesbery, *J Neurochem*, 2000. 75(1).Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. p. 436-9.
124. Kellett, K.A. and N.M. Hooper, *Prion*, 2009. 3(4).Prion protein and Alzheimer disease. p. 190-4.
125. Kercher, L., C. Favara, J.F. Striebel, R. LaCasse, and B. Chesebro, *J Virol*, 2007. 81(19).Prion protein expression differences in microglia and astroglia influence scrapie-induced neurodegeneration in the retina and brain of transgenic mice. p. 10340-51.
126. Khatri, P., P. Bhavsar, G. Bawa, and S. Draghici, *Nucleic Acids Res*, 2004. 32(Web Server issue).Onto-Tools: an ensemble of web-accessible, ontology-based tools for the functional design and interpretation of high-throughput gene expression experiments. p. W449-56.
127. Khatri, P., C. Voichita, K. Kattan, N. Ansari, A. Khatri, C. Georgescu, A.L. Tarca, and S. Draghici, *Nucleic Acids Res*, 2007. 35(Web Server issue).Onto-Tools: new additions and improvements in 2006. p. W206-11.
128. Kim, J.H., T.M. Chang, A.N. Graham, K.H. Choo, P. Kalitsis, and D.F. Hudson, *BMC Biochem*, 2010. 11.Streptavidin-Binding Peptide (SBP)-tagged SMC2 allows single-step affinity fluorescence, blotting or purification of the condensin complex. p. 50.
129. Kirkitadze, M.D., M.M. Condrón, and D.B. Teplow, *J Mol Biol*, 2001. 312(5).Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid beta-protein fibrillogenesis. p. 1103-19.
130. Klafki, H., D. Abramowski, R. Swoboda, P.A. Paganetti, and M. Staufenbiel, *J Biol Chem*, 1996. 271(45). The carboxyl termini of beta-amyloid peptides 1-40 and 1-42 are generated by distinct gamma-secretase activities. p. 28655-9.
131. Kondo, T., H. Higashi, H. Nishizawa, S. Ishikawa, S. Ashizawa, M. Yamada, Z. Makita, T. Koike, and M. Hatakeyama, *J Biol Chem*, 2001. 276(20).Involvement of pRB-related p107 protein in the inhibition of S phase progression in response to genotoxic stress. p. 17559-67.
132. Kong, L.N., P.P. Zuo, L. Mu, Y.Y. Liu, and N. Yang, *Acta Pharmacol Sin*, 2005. 26(6).Gene expression profile of amyloid beta protein-injected mouse model for Alzheimer disease. p. 666-72.
133. Kongruttanachok, N., C. Phuangphairoj, A. Thongnak, W. Ponyeam, P. Rattanatanyong, W.

- Pornthanakasem, and A. Mutirangura, *Mol Cancer*, 2010. 9.Replication independent DNA double-strand break retention may prevent genomic instability. p. 70.
134. Kops, G.J., D.R. Foltz, and D.W. Cleveland, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(23).Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint. p. 8699-704.
135. Kosik, K.S., C.L. Joachim, and D.J. Selkoe, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. 83(11).Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. p. 4044-8.
136. Kourie, J.I., *Chem Biol Interact*, 2001. 138(1).Mechanisms of prion-induced modifications in membrane transport properties: implications for signal transduction and neurotoxicity. p. 1-26.
137. Krasnianski, A., N. von Ahsen, U. Heinemann, B. Meissner, H.A. Kretzschmar, V.W. Armstrong, and I. Zerr, *J Mol Neurosci*, 2008. 34(1).ApoE distribution and family history in genetic prion diseases in Germany. p. 45-50.
138. Kristiansen, M., P. Deriziotis, D.E. Dimcheff, G.S. Jackson, H. Ovaa, H. Naumann, A.R. Clarke, F.W. van Leeuwen, V. Menendez-Benito, N.P. Dantuma, J.L. Portis, J. Collinge, and S.J. Tabrizi, *Mol Cell*, 2007. 26(2).Disease-associated prion protein oligomers inhibit the 26S proteasome. p. 175-88.
139. Kubo, T., S. Nishimura, Y. Kumagae, and I. Kaneko, *J Neurosci Res*, 2002. 70(3).In vivo conversion of racemized beta-amyloid ([D-Ser 26]A beta 1-40) to truncated and toxic fragments ([D-Ser 26]A beta 25-35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients. p. 474-83.
140. Kuwata, K., T. Matumoto, H. Cheng, K. Nagayama, T.L. James, and H. Roder, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(25).NMR-detected hydrogen exchange and molecular dynamics simulations provide structural insight into fibril formation of prion protein fragment 106-126. p. 14790-5.
141. Lauren, J., D.A. Gimbel, H.B. Nygaard, J.W. Gilbert, and S.M. Strittmatter, *Nature*, 2009. 457(7233). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. p. 1128-32.
142. Lee, S.J., P. Desplats, C. Sigurdson, I. Tsigelny, and E. Masliah, *Nat Rev Neurol*, 2010. 6(12).Cell-to-cell transmission of non-prion protein aggregates. p. 702-6.
143. Lefever, S., J. Vandesompele, F. Speleman, and F. Pattyn, *Nucleic Acids Res*, 2009. 37(Database issue). RTPPrimerDB: the portal for real-time PCR primers and probes. p. D942-5.
144. Lescheid, D.W., E. Terasawa, L.A. Abler, H.F. Urbanski, C.M. Warby, R.P. Millar, and N.M. Sherwood, *Endocrinology*, 1997. 138(12).A second form of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) with characteristics of chicken GnRH-II is present in the primate brain. p. 5618-29.
145. Li, H., M.S. Wolfe, and D.J. Selkoe, *Structure*, 2009. 17(3).Toward structural elucidation of the gamma-secretase complex. p. 326-34.
146. Li, L., H.J. Tsai, L. Li, and X.M. Wang, *Am J Chin Med*, 2010. 38(1).Icariin inhibits the increased inward calcium currents induced by amyloid-beta(25-35) peptide in CA1 pyramidal neurons of neonatal rat hippocampal slice. p. 113-25.
147. Li, Y. and R. Benezra, *Science*, 1996. 274(5285).Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. p. 246-8.
148. Lichtenthaler, S.F. and C. Haass, *J Clin Invest*, 2004. 113(10).Amyloid at the cutting edge: activation of alpha-secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model. p. 1384-7.
149. Ligeret, H., S. Barthelemy, R. Zini, J.P. Tillement, S. Labidalle, and D. Morin, *Free Radic Biol Med*, 2004. 36(7).Effects of curcumin and curcumin derivatives on mitochondrial permeability transition pore. p. 919-29.
150. Lin, M.L., Y.C. Lu, H.L. Su, H.T. Lin, C.C. Lee, S.E. Kang, T.C. Lai, J.G. Chung, and S.S. Chen, *J Cell Biochem*, 2011.Destabilization of CARP mRNAs by aloe-emodin contributes to caspase-8-mediated p53-independent apoptosis of human carcinoma cells. p.
151. Ling, Y., K. Morgan, and N. Kalsheker, *Int J Biochem Cell Biol*, 2003. 35(11).Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. p. 1505-35.
152. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Methods*, 2001. 25(4).Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. p. 402-8.
153. Loo, D.T., A. Copani, C.J. Pike, E.R. Whittemore, A.J. Walencewicz, and C.W. Cotman, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(17).Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. p. 7951-5.
154. Lopes, J.P., C.R. Oliveira, and P. Agostinho, *Curr Alzheimer Res*, 2009. 6(3).Cell cycle re-entry in Alzheimer's disease: a major neuropathological characteristic? p. 205-12.

155. Maccioni, R.B. and V. Cambiazo, *Physiol Rev*, 1995. 75(4).Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. p. 835-64.

156. Maccioni, R.B., C. Oth, Concha, II, and J.P. Munoz, *Eur J Biochem*, 2001. 268(6).The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology. p. 1518-27.

157. Mah, L.J., A. El-Osta, and T.C. Karagiannis, *Leukemia*, 2010. 24(4).gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. p. 679-86.

158. Mandelkow, E., Y.H. Song, O. Schweers, A. Marx, and E.M. Mandelkow, *Neurobiol Aging*, 1995. 16(3).On the structure of microtubules, tau, and paired helical filaments. p. 347-54.

159. Manly, J.J., C.A. Merchant, D.M. Jacobs, S.A. Small, K. Bell, M. Ferin, and R. Mayeux, *Neurology*, 2000. 54(4).Endogenous estrogen levels and Alzheimer's disease among postmenopausal women. p. 833-7.

160. Marella, M., C. Gaggioli, M. Batoz, M. Deckert, S. Tartare-Deckert, and J. Chabry, *J Biol Chem*, 2005. 280(2).Pathological prion protein exposure switches on neuronal mitogen-activated protein kinase pathway resulting in microglia recruitment. p. 1529-34.

161. Martinez, T. and A. Pascual, *Eur J Neurosci*, 2007. 26(1).Identification of genes differentially expressed in SH-SY5Y neuroblastoma cells exposed to the prion peptide 106-126. p. 51-9.

162. Masters, C.L., G. Simms, N.A. Weinman, G. Multhaup, B.L. McDonald, and K. Beyreuther, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. 82(12).Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. p. 4245-9.

163. Matsuda, N. and K. Tanaka, *J Alzheimers Dis*, 2010. 19(1).Does impairment of the ubiquitin-proteasome system or the autophagy-lysosome pathway predispose individuals to neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease? p. 1-9.

164. Mattson, M.P., *Neurobiol Aging*, 1994. 15 Suppl 2.Mechanism of neuronal degeneration and preventative approaches: quickening the pace of AD research. p. S121-5.

165. McGeer, P.L. and E.G. McGeer, *Brain Res Brain Res Rev*, 1995. 21(2).The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. p. 195-218.

166. McLaurin, J., T. Franklin, P.E. Fraser, and A. Chakrabarty, *J Biol Chem*, 1998. 273(8).Structural transitions associated with the interaction of Alzheimer beta-amyloid peptides with gangliosides. p. 4506-15.

167. McPhie, D.L., R. Coopersmith, A. Hines-Peralta, Y. Chen, K.J. Ivins, S.P. Manly, M.R. Kozlowski, K.A. Neve, and R.L. Neve, *J Neurosci*, 2003. 23(17).DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial Alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3. p. 6914-27.

168. McShea, A., H.G. Lee, R.B. Petersen, G. Casadesus, I. Vincent, N.J. Linford, J.O. Funk, R.A. Shapiro, and M.A. Smith, *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1772(4).Neuronal cell cycle re-entry mediates Alzheimer disease-type changes. p. 467-72.

169. Meethal, S.V., M.A. Smith, R.L. Bowen, and C.S. Atwood, *Endocrine*, 2005. 26(3).The gonadotropin connection in Alzheimer's disease. p. 317-26.

170. Meraldi, P., V.M. Draviam, and P.K. Sorger, *Dev Cell*, 2004. 7(1).Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. p. 45-60.

171. Miller, J.A., S. Horvath, and D.H. Geschwind, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(28).Divergence of human and mouse brain transcriptome highlights Alzheimer disease pathways. p. 12698-703.

172. Misiti, F., M.E. Clementi, and B. Giardina, *Neurochem Int*, 2010. 56(4).Oxidation of methionine 35 reduces toxicity of the amyloid beta-peptide(1-42) in neuroblastoma cells (IMR-32) via enzyme methionine sulfoxide reductase A expression and function. p. 597-602.

173. Mitchell, R., P.J. Sim, T. Leslie, M.S. Johnson, and F.J. Thomson, *J Endocrinol*, 1994. 140(2).Activation of MAP kinase associated with the priming effect of LHRH. p. R15-8.

174. Mitsuda, T., Y. Hayakawa, M. Itoh, K. Ohta, and T. Nakagawa, *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 352(3).ATF4 regulates gamma-secretase activity during amino acid imbalance. p. 722-7.

175. Morales, R., L.D. Estrada, R. Diaz-Espinoza, D. Morales-Scheiing, M.C. Jara, J. Castilla, and C. Soto, *J Neurosci*, 2010. 30(13).Molecular cross talk between misfolded proteins in animal models of Alzheimer's and prion diseases. p. 4528-35.

176. Morgan, C., M. Colombres, M.T. Nunez, and N.C. Inestrosa, *Prog Neurobiol*, 2004. 74(6).Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease. p. 323-49.

177. Morita, E., V. Sandrin, H.Y. Chung, S.G. Morham, S.P. Gygi, C.K. Rodesch, and W.I. Sundquist, *Embo J*, 2007. 26(19).Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. p. 4215-27.

178. Mosch, B., M. Morawski, A. Mittag, D. Lenz, A. Tarnok, and T. Arendt, *J Neurosci*, 2007. 27(26).Aneuploidy and DNA replication in the normal human brain and Alzheimer's disease. p. 6859-67.
179. Muhleisen, H., J. Gehrmann, and R. Meyermann, *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1995. 21(6).Reactive microglia in Creutzfeldt-Jakob disease. p. 505-17.
180. Muller, T., H.E. Meyer, R. Egensperger, and K. Marcus, *Prog Neurobiol*, 2008. 85(4).The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease. p. 393-406.
181. Murphy, M., M.G. Stinnakre, C. Senamaud-Beaufort, N.J. Winston, C. Sweeney, M. Kubelka, M. Carrington, C. Brechot, and J. Sobczak-Thepot, *Nat Genet*, 1997. 15(1).Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. p. 83-6.
182. Nagy, Z., *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1772(4).The dysregulation of the cell cycle and the diagnosis of Alzheimer's disease. p. 402-8.
183. Neve, R.L., D.L. McPhie, and Y. Chen, *Brain Res*, 2000. 886(1-2).Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein(1). p. 54-66.
184. Nitta, K., A. Sakudo, J. Masuyama, G. Xue, K. Sugiura, and T. Onodera, *Protein Pept Lett*, 2009. 16(3). Role of cellular prion proteins in the function of macrophages and dendritic cells. p. 239-46.
185. Noble, W., V. Olm, K. Takata, E. Casey, O. Mary, J. Meyerson, K. Gaynor, J. LaFrancois, L. Wang, T. Kondo, P. Davies, M. Burns, Veeranna, R. Nixon, D. Dickson, Y. Matsuoka, M. Ahljanian, L.F. Lau, and K. Duff, *Neuron*, 2003. 38(4).Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. p. 555-65.
186. Nospikel, T. and P.C. Hanawalt, *DNA Repair (Amst)*, 2002. 1(1).DNA repair in terminally differentiated cells. p. 59-75.
187. Nospikel, T. and P.C. Hanawalt, *Bioessays*, 2003. 25(2).When parsimony backfires: neglecting DNA repair may doom neurons in Alzheimer's disease. p. 168-73.
188. Ohm, T.G., M. Schmitt, J. Bohl, and B. Lemmer, *Neurobiol Aging*, 1997. 18(3).Decrease in adenylate cyclase activity antecedes neurofibrillary tangle formation. p. 275-9.
189. Ohtoshi, A., T. Maeda, H. Higashi, S. Ashizawa, and M. Hatakeyama, *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. 268(2).Human p55(CDC)/Cdc20 associates with cyclin A and is phosphorylated by the cyclin A-Cdk2 complex. p. 530-4.
190. Oltersdorf, T., P.J. Ward, T. Henriksson, E.C. Beattie, R. Neve, I. Lieberburg, and L.C. Fritz, *J Biol Chem*, 1990. 265(8).The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. p. 4492-7.
191. Ozaki, T., Y. Li, H. Kikuchi, T. Tomita, T. Iwatsubo, and A. Nakagawara, *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 351(1).The intracellular domain of the amyloid precursor protein (AICD) enhances the p53-mediated apoptosis. p. 57-63.
192. Pagano, M., R. Pepperkok, F. Verde, W. Ansorge, and G. Draetta, *Embo J*, 1992. 11(3).Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. p. 961-71.
193. Palmert, M.R., M.B. Podlisny, T.E. Golde, M.L. Cohen, D.M. Kovacs, R.E. Tanzi, J.F. Gusella, P.J. Whitehouse, D.S. Witker, T. Oltersdorf, and et al., *Adv Neurol*, 1990. 51.Analysis of the beta-amyloid protein precursor of Alzheimer's disease: mRNAs and protein products. p. 181-4.
194. Pan, K.M., M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R.J. Fletterick, F.E. Cohen, and et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(23).Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. p. 10962-6.
195. Parkin, E.T., N.T. Watt, I. Hussain, E.A. Eckman, C.B. Eckman, J.C. Manson, H.N. Baybutt, A.J. Turner, and N.M. Hooper, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(26).Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. p. 11062-7.
196. Pattyn, F., F. Speleman, A. De Paepe, and J. Vandesompele, *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(1).RTPPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database. p. 122-3.
197. Petroski, M.D. and R.J. Deshaies, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. 6(1).Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. p. 9-20.
198. Peyrin, J.M., C.I. Lasmezas, S. Haik, F. Tagliavini, M. Salmona, A. Williams, D. Richie, J.P. Deslys, and D. Dormont, *Neuroreport*, 1999. 10(4).Microglial cells respond to amyloidogenic PrP peptide by the production of inflammatory cytokines. p. 723-9.
199. Pickering-Brown, S.M., D.M. Mann, F. Owen, J.W. Ironside, R. de Silva, D.A. Roberts, D.J. Balderson, and P.N. Cooper, *Neurosci Lett*, 1995. 187(2).Allelic variations in apolipoprotein E and prion protein genotype

related to plaque formation and age of onset in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. p. 127-9.

200. Pike, C.J., D. Burdick, A.J. Walencewicz, C.G. Glabe, and C.W. Cotman, *J Neurosci*, 1993. 13(4). Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. p. 1676-87.

201. Pines, J. and T. Hunter, *Nature*, 1990. 346(6286). Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. p. 760-3.

202. Pines, J. and T. Hunter, *Trends Cell Biol*, 1991. 1(5). Cyclin-dependent kinases: a new cell cycle motif? p. 117-21.

203. Pines, J. and T. Hunter, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1991. 56. Human cell division: the involvement of cyclins A and B1, and multiple cdc2s. p. 449-63.

204. Poehlmann, A. and A. Roessner, *Pathol Res Pract*, 2010. 206(9). Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers. p. 591-601.

205. Ponte, P., P. Gonzalez-DeWhitt, J. Schilling, J. Miller, D. Hsu, B. Greenberg, K. Davis, W. Wallace, I. Lieberburg, and F. Fuller, *Nature*, 1988. 331(6156). A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. p. 525-7.

206. Price, J.A., J.H. Price, P.M. Shanahan, and S.M. Desmond, *Psychol Rep*, 1986. 58(2). Elderly persons' perceptions and knowledge of Alzheimer's disease. p. 419-24.

207. Prusiner, S.B., *Science*, 1991. 252(5012). Molecular biology of prion diseases. p. 1515-22.

208. Prusiner, S.B., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(23). Prions. p. 13363-83.

209. Prusiner, S.B., M.R. Scott, S.J. DeArmond, and F.E. Cohen, *Cell*, 1998. 93(3). Prion protein biology. p. 337-48.

210. Qiu, C., M. Kivipelto, and E. von Strauss, *Dialogues Clin Neurosci*, 2009. 11(2). Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. p. 111-28.

211. Reed, S.I., *Cancer Surv*, 1997. 29. Control of the G1/S transition. p. 7-23.

212. Rensink, A.A., R.M. de Waal, B. Kremer, and M.M. Verbeek, *Brain Res Brain Res Rev*, 2003. 43(2). Pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy. p. 207-23.

213. Rigter, A., J. Priem, D. Timmers-Parohi, J.P. Langeveld, F.G. van Zijderveld, and A. Bossers, *BMC Biochem*, 2009. 10. Prion protein self-peptides modulate prion interactions and conversion. p. 29.

214. Roher, A., D. Wolfe, M. Palutke, and D. KuKuruga, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. 83(8). Purification, ultrastructure, and chemical analysis of Alzheimer disease amyloid plaque core protein. p. 2662-6.

215. Roucou, X. and A.C. LeBlanc, *J Mol Med*, 2005. 83(1). Cellular prion protein neuroprotective function: implications in prion diseases. p. 3-11.

216. Rozen, S. and H. Skaletsky, *Methods Mol Biol*, 2000. 132. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. p. 365-86.

217. Ruiz-Leon, Y. and A. Pascual, *Neuroscience*, 2003. 120(4). Induction of tyrosine kinase receptor b by retinoic acid allows brain-derived neurotrophic factor-induced amyloid precursor protein gene expression in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. p. 1019-26.

218. Saeed, A.I., V. Sharov, J. White, J. Li, W. Liang, N. Bhagabati, J. Braisted, M. Klapa, T. Currier, M. Thiagarajan, A. Sturn, M. Snuffin, A. Rezantsev, D. Popov, A. Ryltsov, E. Kostukovich, I. Borisovsky, Z. Liu, A. Vinsavich, V. Trush, and J. Quackenbush, *Biotechniques*, 2003. 34(2). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. p. 374-8.

219. Saffin, J.M., M. Venoux, C. Prigent, J. Espeut, F. Poulat, D. Giorgi, A. Abrieu, and S. Rouquier, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(32). ASAP, a human microtubule-associated protein required for bipolar spindle assembly and cytokinesis. p. 11302-7.

220. Sak, A. and M. Stuschke, *Semin Radiat Oncol*, 2010. 20(4). Use of gammaH2AX and other biomarkers of double-strand breaks during radiotherapy. p. 223-31.

221. Sanchez, I. and B.D. Dynlacht, *Curr Opin Cell Biol*, 1996. 8(3). Transcriptional control of the cell cycle. p. 318-24.

222. Sanghera, N., M. Wall, C. Venien-Bryan, and T.J. Pinheiro, *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1784(6). Globular and pre-fibrillar prion aggregates are toxic to neuronal cells and perturb their electrophysiology. p. 873-81.

223. Saragoni, L., P. Hernandez, and R.B. Maccioni, *Neurochem Res*, 2000. 25(1). Differential association of tau with subsets of microtubules containing posttranslationally-modified tubulin variants in neuroblastoma cells. p. 59-70.

224. Sardar, H.S., V.G. Luczak, M.M. Lopez, B.C. Lister, and S.P. Gilbert, *Curr Biol*, 2010. 20(18). Mitotic kinesin

CENP-E promotes microtubule plus-end elongation. p. 1648-53.

225. Satoh, J. and T. Yamamura, *Cell Mol Neurobiol*, 2004. 24(6).Gene expression profile following stable expression of the cellular prion protein. p. 793-814.

226. Satoh, J., Y. Kuroda, and S. Katamine, *Am J Pathol*, 2000. 157(1).Gene expression profile in prion protein-deficient fibroblasts in culture. p. 59-68.

227. Schneeberger, C., P. Speiser, F. Kury, and R. Zeillinger, *PCR Methods Appl*, 1995. 4(4).Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. p. 234-8.

228. Schweers, O., E.M. Mandelkow, J. Biernat, and E. Mandelkow, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(18). Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments. p. 8463-7.

229. Sekiguchi, J., D.O. Ferguson, H.T. Chen, E.M. Yang, J. Earle, K. Frank, S. Whitlow, Y. Gu, Y. Xu, A. Nussenzweig, and F.W. Alt, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(6).Genetic interactions between ATM and the nonhomologous end-joining factors in genomic stability and development. p. 3243-8.

230. Selkoe, D.J., *N Engl J Med*, 1989. 320(22).Aging, amyloid, and Alzheimer's disease. p. 1484-7.

231. Selkoe, D.J., *J Neuropathol Exp Neurol*, 1994. 53(5).Alzheimer's disease: a central role for amyloid. p. 438-47.

232. Selkoe, D.J. and D. Schenk, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2003. 43.Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. p. 545-84.

233. Shoji, M., T.E. Golde, J. Ghiso, T.T. Cheung, S. Estus, L.M. Shaffer, X.D. Cai, D.M. McKay, R. Tintner, B. Frangione, and et al., *Science*, 1992. 258(5079).Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. p. 126-9.

234. Sillje, H.H., K. Takahashi, K. Tanaka, G. Van Houwe, and E.A. Nigg, *Embo J*, 1999. 18(20).Mammalian homologues of the plant Tousled gene code for cell-cycle-regulated kinases with maximal activities linked to ongoing DNA replication. p. 5691-702.

235. Sironi, L., M. Mapelli, S. Knapp, A. De Antoni, K.T. Jeang, and A. Musacchio, *Embo J*, 2002. 21(10).Crystal structure of the tetrameric Mad1-Mad2 core complex: implications of a 'safety belt' binding mechanism for the spindle checkpoint. p. 2496-506.

236. Sisodia, S.S., E.H. Koo, P.N. Hoffman, G. Perry, and D.L. Price, *J Neurosci*, 1993. 13(7).Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. p. 3136-42.

237. Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Klenk, *Anal Biochem*, 1985. 150(1).Measurement of protein using bicinchoninic acid. p. 76-85.

238. Solforosi, L., J.R. Criado, D.B. McGavern, S. Wirz, M. Sanchez-Alavez, S. Sugama, L.A. DeGiorgio, B.T. Volpe, E. Wiseman, G. Abalos, E. Masliah, D. Gilden, M.B. Oldstone, B. Conti, and R.A. Williamson, *Science*, 2004. 303(5663).Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. p. 1514-6.

239. Sorby, R., L. Austbo, C.M. Press, G. Skretting, T. Landsverk, and A. Espenes, *PLoS One*, 2009. 4(9). PrP expression, PrPSc accumulation and innervation of splenic compartments in sheep experimentally infected with scrapie. p. e6885.

240. Soreghan, B., C. Pike, R. Kayed, W. Tian, S. Milton, C. Cotman, and C.G. Glabe, *Neuromolecular Med*, 2002. 1(1).The influence of the carboxyl terminus of the Alzheimer Abeta peptide on its conformation, aggregation, and neurotoxic properties. p. 81-94.

241. Sorensen, G., S. Medina, D. Parchaliuk, C. Phillipson, C. Robertson, and S.A. Booth, *BMC Genomics*, 2008. 9.Comprehensive transcriptional profiling of prion infection in mouse models reveals networks of responsive genes. p. 114.

242. Soto, C., *Nat Rev Neurosci*, 2003. 4(1).Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. p. 49-60.

243. Soto, C. and L.D. Estrada, *Arch Neurol*, 2008. 65(2).Protein misfolding and neurodegeneration. p. 184-9.

244. Soto, C., E.M. Castano, B. Frangione, and N.C. Inestrosa, *J Biol Chem*, 1995. 270(7).The alpha-helical to beta-strand transition in the amino-terminal fragment of the amyloid beta-peptide modulates amyloid formation. p. 3063-7.

245. Spandidos, A., X. Wang, H. Wang, and B. Seed, *Nucleic Acids Res*, 2010. 38(Database issue).PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. p. D792-9.

246. Sperling, R.A., P.S. Laviolette, K. O'Keefe, J. O'Brien, D.M. Rentz, M. Pihlajamaki, G. Marshall, B.T. Hyman, D.J. Selkoe, T. Hedden, R.L. Buckner, J.A. Becker, and K.A. Johnson, *Neuron*, 2009. 63(2). Amyloid deposition is associated with impaired default network function in older persons without dementia. p. 178-88.

247. Sturn, A., J. Quackenbush, and Z. Trajanoski, *Bioinformatics*, 2002. 18(1). Genesis: cluster analysis of microarray data. p. 207-8.

248. Suazo, M., C. Hodar, C. Morgan, W. Cerpa, V. Cambiazo, N.C. Inestrosa, and M. Gonzalez, *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. 382(4). Overexpression of amyloid precursor protein increases copper content in HEK293 cells. p. 740-4.

249. Sun, X.D., Z.L. Mo, B.M. Taylor, and D.E. Epps, *Neurobiol Dis*, 2003. 14(3). A slowly formed transient conformer of Aβ(1-40) is toxic to inward channels of dissociated hippocampal and cortical neurons of rats. p. 567-78.

250. Swatton, J.E., L.A. Sellers, R.L. Faull, A. Holland, S. Iritani, and S. Bahn, *Eur J Neurosci*, 2004. 19(10). Increased MAP kinase activity in Alzheimer's and Down syndrome but not in schizophrenia human brain. p. 2711-9.

251. Tagliavini, F., F. Prelli, L. Verga, G. Giaccone, R. Sarma, P. Gorevic, B. Ghetti, F. Passerini, E. Ghibaudi, G. Forloni, and et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(20). Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils in vitro. p. 9678-82.

252. Takekawa, M. and H. Saito, *Cell*, 1998. 95(4). A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. p. 521-30.

253. Takuma, H., T. Tomiyama, K. Kuida, and H. Mori, *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004. 63(3). Amyloid beta peptide-induced cerebral neuronal loss is mediated by caspase-3 in vivo. p. 255-61.

254. Tebbenkamp, A.T. and D.R. Borchelt, *Methods Mol Biol*, 2009. 566. Protein aggregate characterization in models of neurodegenerative disease. p. 85-91.

255. Terry, R.D., *Prog Brain Res*, 1994. 101. Neuropathological changes in Alzheimer disease. p. 383-90.

256. Terry, R.D., L.A. Hansen, R. DeTeresa, P. Davies, H. Tobias, and R. Katzman, *J Neuropathol Exp Neurol*, 1987. 46(3). Senile dementia of the Alzheimer type without neocortical neurofibrillary tangles. p. 262-8.

257. Timofeev, O., O. Cizmecioglu, F. Settele, T. Kempf, and I. Hoffmann, *J Biol Chem*, 2010. 285(22). Cdc25 phosphatases are required for timely assembly of CDK1-cyclin B at the G2/M transition. p. 16978-90.

258. Tomita, S., Y. Kirino, and T. Suzuki, *J Biol Chem*, 1998. 273(11). Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) by secretases occurs after O-glycosylation of APP in the protein secretory pathway. Identification of intracellular compartments in which APP cleavage occurs without using toxic agents that interfere with protein metabolism. p. 6277-84.

259. Torres, M., K. Castillo, R. Armisen, A. Stutzin, C. Soto, and C. Hetz, *PLoS One*, 2010. 5(12). Prion protein misfolding affects calcium homeostasis and sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress. p. e15658.

260. Tukey, J., *Quarterly of Applied Mathematics*, 1972(30). Data analysis computation and mathematics. p. 51-65.

261. Uemura, K., N. Kitagawa, R. Kohno, A. Kuzuya, T. Kageyama, H. Shibasaki, and S. Shimohama, *J Neurosci Res*, 2003. 73(2). Presenilin 1 mediates retinoic acid-induced differentiation of SH-SY5Y cells through facilitation of Wnt signaling. p. 166-75.

262. Varghese, K., P. Molnar, M. Das, N. Bhargava, S. Lambert, M.S. Kindy, and J.J. Hickman, *PLoS One*. 5(1). A new target for amyloid beta toxicity validated by standard and high-throughput electrophysiology. p. e8643.

263. Vazquez, M.C., L.M. Vargas, N.C. Inestrosa, and A.R. Alvarez, *J Cell Physiol*, 2009. 220(1). c-Abl modulates AICD dependent cellular responses: transcriptional induction and apoptosis. p. 136-43.

264. Veerhuis, R., J.J. Hoozemans, I. Janssen, R.S. Boshuizen, J.P. Langeveld, and P. Eikelenboom, *Brain Res*, 2002. 925(2). Adult human microglia secrete cytokines when exposed to neurotoxic prion protein peptide: no intermediary role for prostaglandin E2. p. 195-203.

265. Venoux, M., K. Delmouly, O. Milhavel, S. Vidal-Eychenie, D. Giorgi, and S. Rouquier, *BMC Genomics*, 2008. 9. Gene organization, evolution and expression of the microtubule-associated protein ASAP (MAP9). p. 406.

266. Ventii, K.H. and K.D. Wilkinson, *Biochem J*, 2008. 414(2). Protein partners of deubiquitinating enzymes. p. 161-75.

267. Vickers, J.C., T.C. Dickson, P.A. Adlard, H.L. Saunders, C.E. King, and G. McCormack, *Prog Neurobiol*,

2000. 60(2).The cause of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. p. 139-65.

268. Wadsworth, J.D., S. Joiner, A.F. Hill, T.A. Campbell, M. Desbruslais, P.J. Luthert, and J. Collinge, *Lancet*, 2001. 358(9277).Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. p. 171-80.

269. Wang, H., A. Zhao, L. Chen, X. Zhong, J. Liao, M. Gao, M. Cai, D.H. Lee, J. Li, D. Chowdhury, Y.G. Yang, G.P. Pfeifer, Y. Yen, and X. Xu, *Carcinogenesis*, 2009. 30(8).Human RIF1 encodes an anti-apoptotic factor required for DNA repair. p. 1314-9.

270. Wang, L., W. Chadwick, S.S. Park, Y. Zhou, N. Silver, B. Martin, and S. Maudsley, *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2010. 9(5).Gonadotropin-releasing hormone receptor system: modulatory role in aging and neurodegeneration. p. 651-60.

271. Wang, X. and B. Seed, *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(24).A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. p. e154.

272. Webber, K.M., A.K. Raina, M.W. Marlatt, X. Zhu, M.I. Prat, L. Morelli, G. Casadesus, G. Perry, and M.A. Smith, *Mech Ageing Dev*, 2005. 126(10).The cell cycle in Alzheimer disease: a unique target for neuropharmacology. p. 1019-25.

273. Wegiel, J., K.C. Wang, H. Imaki, R. Rubenstein, A. Wronska, M. Osuchowski, W.J. Lipinski, L.C. Walker, and H. LeVine, *Neurobiol Aging*, 2001. 22(1).The role of microglial cells and astrocytes in fibrillar plaque evolution in transgenic APP(SW) mice. p. 49-61.

274. Weinberg, R.A., *Cell*, 1995. 81(3).The retinoblastoma protein and cell cycle control. p. 323-30.

275. Weissmann, C., *Nat Rev Microbiol*, 2004. 2(11).The state of the prion. p. 861-71.

276. Westergard, L., H.M. Christensen, and D.A. Harris, *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1772(6).The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. p. 629-44.

277. Wilcoxon, F., *Biometrics*, 1945(1).Individual comparisons by ranking methods. p. 80-83.

278. Wong, C.W., V. Quaranta, and G.G. Glenner, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. 82(24).Neuritic plaques and cerebrovascular amyloid in Alzheimer disease are antigenically related. p. 8729-32.

279. Wyss-Coray, T. and L. Mucke, *Neuron*, 2002. 35(3).Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. p. 419-32.

280. Xia, M.Q. and B.T. Hyman, *J Neurovirol*, 1999. 5(1).Chemokines/chemokine receptors in the central nervous system and Alzheimer's disease. p. 32-41.

281. Xiang, W., O. Windl, G. Wunsch, M. Dugas, A. Kohlmann, N. Dierkes, I.M. Westner, and H.A. Kretzschmar, *J Virol*, 2004. 78(20).Identification of differentially expressed genes in scrapie-infected mouse brains by using global gene expression technology. p. 11051-60.

282. Xu, X., D. Yang, T. Wyss-Coray, J. Yan, L. Gan, Y. Sun, and L. Mucke, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(13).Wild-type but not Alzheimer-mutant amyloid precursor protein confers resistance against p53-mediated apoptosis. p. 7547-52.

283. Yan, S.D., H. Zhu, A. Zhu, A. Golabek, H. Du, A. Roher, J. Yu, C. Soto, A.M. Schmidt, D. Stern, and M. Kindy, *Nat Med*, 2000. 6(6).Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis. p. 643-51.

284. Yang, J., Z.P. Xu, Y. Huang, H.E. Hamrick, P.J. Duerksen-Hughes, and Y.N. Yu, *World J Gastroenterol*, 2004. 10(2).ATM and ATR: sensing DNA damage. p. 155-60.

285. Yang, R., C. Muller, V. Huynh, Y.K. Fung, A.S. Yee, and H.P. Koeffler, *Mol Cell Biol*, 1999. 19(3).Functions of cyclin A1 in the cell cycle and its interactions with transcription factor E2F-1 and the Rb family of proteins. p. 2400-7.

286. Yang, T.T., C.T. Hsu, and Y.M. Kuo, *J Neural Transm*, 2009. 116(12).Cell-derived soluble oligomers of human amyloid-beta peptides disturb cellular homeostasis and induce apoptosis in primary hippocampal neurons. p. 1561-9.

287. Yang, Y. and K. Herrup, *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1772(4).Cell division in the CNS: protective response or lethal event in post-mitotic neurons? p. 457-66.

288. Yang, Y., D.S. Geldmacher, and K. Herrup, *J Neurosci*, 2001. 21(8).DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. p. 2661-8.

289. Yankner, B.A., L.R. Dawes, S. Fisher, L. Villa-Komaroff, M.L. Oster-Granite, and R.L. Neve, *Science*, 1989. 245(4916).Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. p. 417-20.

290. Ye, X., *Histol Histopathol*, 2009. 24(12).Visual pathology in animal prion diseases. p. 1563-77.

291. Yen, T.J., G. Li, B.T. Schaar, I. Szilak, and D.W. Cleveland, *Nature*, 1992. 359(6395).CENP-E is a putative
kinetochore motor that accumulates just before mitosis. p. 536-9.
292. Young-Pearse, T.L., J. Bai, R. Chang, J.B. Zheng, J.J. LoTurco, and D.J. Selkoe, *J Neurosci*, 2007.
27(52).A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero
RNA interference. p. 14459-69.
293. Zhang, Y. and E. Lees, *Mol Cell Biol*, 2001. 21(15).Identification of an overlapping binding domain on
Cdc20 for Mad2 and anaphase-promoting complex: model for spindle checkpoint regulation. p. 5190-9.
294. Zhu, X., A.K. Raina, and M.A. Smith, *Am J Pathol*, 1999. 155(2).Cell cycle events in neurons. Proliferation
or death? p. 327-9.
295. Zhu, X., H.G. Lee, G. Perry, and M.A. Smith, *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1772(4).Alzheimer disease, the
two-hit hypothesis: an update. p. 494-502.
296. Zomosa-Signoret, V., J.D. Arnaud, P. Fontes, M.T. Alvarez-Martinez, and J.P. Liautard, *Vet Res*, 2008.
39(4).Physiological role of the cellular prion protein. p. 9.

8. ANEXOS

INSTRUCCIONES DE USO DE LOS ANEXOS.

Dada La complejidad de los datos obtenidos de *microarrays*, gran parte de los datos obtenidos en la realización de esta memoria se han adjuntado **como Anexos en un DVD** para facilitar su consulta.

Anexos I _LISTAS GENES.

Se incluyen en una hoja Excel las listas de genes obtenidas tras el filtrado y procesamiento de los datos en cuatro pestañas diferentes correspondientes a cada uno de los cuatro grupos de genes sobre-expresados o reprimidos por cada tratamiento. Aplicando la función “Autofiltro” disponible entre las herramientas de las hojas Excel, se podrá seleccionar el parámetro que se desee consultar (*Descripción del gen, Gene Symbol, Probeset ID, Anotación Biológica y Ontológica, número de veces en el array, SLR, Tasa de cambio*) facilitando así su consulta. Para poder utilizar la función autofiltro: Situar en la fila del encabezado → Herramientas → Filtro → Autofiltro → A continuación aparece en cada casilla una flecha, que permite seleccionar el parámetro que se desea filtrar.

Anexo II _Resultados _AB.

Se incluyen en una hoja Excel las distintas Funciones Moleculares, Procesos Biológicos, Componentes celulares y Rutas Biológicas correspondientes al Aβ 25-35. En cada pestaña se incluyen todos los procesos significativos (marcados en gris) y en la hoja consecutiva, los genes incluidos en cada uno de los procesos. Aplicando la función “Autofiltro” disponible entre las herramientas de las hojas Excel, se podrá seleccionar el parámetro que se desee consultar (*GO ID, Function Name, Total Input Ids, Total Input Genes, P-Value, y Corrected P-Value (expand:FDR,)*) facilitando así la consulta de los genes incluidos. Para poder utilizar la función autofiltro: Situar en la fila del encabezado → Herramientas → Filtro → Autofiltro → A continuación aparece en cada casilla una flecha, que permite seleccionar el parámetro que se desea filtrar.

Anexo III _Resultados _PRP.

Se incluyen en una hoja Excel las distintas Funciones Moleculares, Procesos Biológicos, Componentes celulares y Rutas Biológicas correspondientes al PrP106-126. En cada pestaña se incluyen todos los procesos significativos (marcados en gris) y en la hoja consecutiva, los genes incluidos en cada uno de los procesos. Aplicando la función “Autofiltro” disponible entre las herramientas de las hojas Excel, se podrá seleccionar el parámetro que se desee consultar (*GO ID, Function Name, Total Input Ids, Total Input Genes, P-Value, y Corrected P-Value (expand:FDR,)*) facilitando así la consulta de los genes incluidos. Para poder utilizar la función autofiltro: Situar en la fila del encabezado → Herramientas → Filtro → Autofiltro → A continuación aparece en cada casilla una flecha, que permite seleccionar el parámetro que se desea filtrar.

Anexo IV _Figuras Tesis _Tamara Martinez

Dada la complejidad de gran parte de las figuras de la tesis, se incluyen en esta carpeta las figuras de toda la tesis para que se puedan consultar en un formato de imagen (.jpg) que facilita la ampliación de la imagen, especialmente en las figuras de las Rutas biológicas. Estas últimas se encuentran tanto en formato .jpg (ver *Figuras Tesis_Tamara_Martinez*) como en pdf (ver *pdf Rutas Biologicas*).

Anexo V _Publicaciones.